

MARINA SONEGHETT COTTA

**Monitoramento de estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculado em culturas
de milho**

Curitiba

2015

MARINA SONEGHETT COTTA

**Monitoramento de estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculado em culturas
de milho**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Ciências
Bioquímicas da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães
Cruz

Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Stets

Curitiba

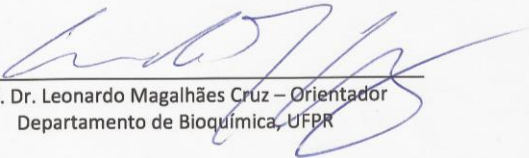
2015

TERMO DE APROVAÇÃO


MARINA SONEGHETT COTA

Monitoramento de estirpes *Azospirillum brasiliense* inoculado em culturas de milho

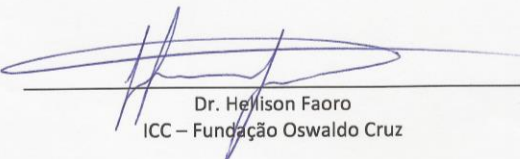
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Profa. Dra. Rose Adèle Monteiro
Departamento de Bioquímica, UFPR



Dr. Helison Faoro
ICC – Fundação Oswaldo Cruz

Curitiba, 24 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Leonardo, pela correção deste trabalho e pela paciência e atenção em todos estes anos de iniciação científica e mestrado sob sua orientação.

À Dra. Maria Isabel, pela co-orientação neste trabalho, que mesmo de muito longe, sempre foi atenciosa e preocupada com a execução deste projeto.

Ao Dr. Gláucio, pelo auxílio e ensinamentos nos experimentos de PCR em tempo real.

À professora Rose Adele e ao Dr. Helisson Faoro por aceitarem participar da banca de defesa da dissertação.

Ao Professor Vandeir e ao grupo da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela colaboração nos experimentos deste projeto.

A todos os professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pelas discussões e opiniões sobre este trabalho.

Aos funcionários Dona Roseli Prado, Valter Baura e Alex, sempre atenciosos e prestativos.

À coordenação da Pós-Graduação, pelo auxílio em nossa formação.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio, pela bolsa e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À Giovana, que foi minha primeira co-orientadora e grande responsável pela minha chegada até aqui.

Aos colegas de laboratório e professoras que acabaram se tornando amigos muito especiais durante a nossa convivência: Vivian, Rose Adele, Nessana, Francinete, Willian, Normanda, Camila, Carina, Fernanda e Popó. E principalmente a aqueles que amo e se tornaram fundamentais nessa caminhada: Tuca e Danilo.

Às minhas amigas indispensáveis, que sempre me apoiaram, me escutaram e me ajudaram, sem as quais tudo seria muito mais difícil e menos divertido: Marina, Bianca, Fernanda, Gabrielle, Kamila, Ludimila e Isabela. Amo vocês!

À minha família, a quem eu dedico meu eterno amor e agradecimento, que acreditou e confiou nas minhas escolhas, me apoiando incondicionalmente para que todos os meus sonhos e objetivos fossem realizados.

E por fim, a Deus, por ter permitido que eu conhecesse todas essas pessoas e que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O milho é um dos principais cereais cultivados no mundo, sendo o Brasil o terceiro produtor mundial deste grão. Devido a esta importância, é desejável buscar alternativas para aumentar sua produtividade. *Azospirillum* é um gênero que contém rizobactérias fixadoras de nitrogênio promotoras do crescimento de plantas. Estas bactérias produzem compostos que estimulam o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, aumentando a capacidade de captação de água e nutrientes, e podem fornecer proteção contra o ataque de fitopatógenos. A associação entre planta e *Azospirillum* spp. é bem sucedida somente quando a população da bactéria está presente em alto número no sistema radicular da planta. Por muito tempo, métodos dependentes e independentes de cultivo não permitiram a quantificação destas comunidades microbianas. Com o advento da PCR em tempo real se tornou possível quantificar populações bacterianas em ambientes complexos com um grau de resolução em nível de estirpe, desejável para o monitoramento de bactérias inoculadas para a promoção do crescimento vegetal de culturas com valor econômico, uma vez que seus efeitos são dependentes da estirpe da bactéria e do genótipo da planta. O objetivo deste trabalho foi verificar e quantificar a permanência das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum* *brasiliense* inoculadas em milho submetidas a diferentes regimes de adubação nitrogenada, em dois experimentos a campo independentes, através da PCR em tempo real quantitativa. Esta técnica permitiu a quantificação das bactérias inoculadas nas amostras de raízes de milho. As estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum* *brasiliense* atingiram níveis da ordem de 10^4 UFC/ g raiz. Entretanto não houve correlação entre as diferenças estatísticas observadas na análise de parâmetros biométricos e de produção, com a quantificação da bactéria inoculada na raiz.

Palavras chave: *Azospirillum* *brasiliense*, PCR em tempo real, inoculantes e milho.

ABSTRACT

Maize is one of the main cultivated cereals in the world and Brazil is the third largest producer of this grain. Due to this importance, is desirable find alternatives to increase its productivity. *Azospirillum* genus contains nitrogen-fixing and plant grown promote rhizobacteria. These bacteria produce compounds to stimulate the development of root plant system, increasing water and nutrient uptake capacity, and can provide protection against phitopathogens attack. The plant and *Azospirillum* spp association is only successful if bacteria population is present at high number on root plant system. For a long time, approaches culture dependent or not did not allow these microbial communities quantification. With real-time PCR advent has become possible quantify bacterial populations in complex environments with a resolution degree in strain level, desirable to monitoring inoculated bacteria to promovegrown plant of crops with economic value, since their effects are dependent on bacteria strain and plant genotype. This study aim was verify and quantify the permanence of Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 strains of *Azospirillum brasilense* inoculated in maize planted on field under different nitrogen fertilization schemes, by real-time PCR. Inoculated bacteria reach level of 10^4 CFU/ root g. However there was no correlation between statistical differences observed in biometric parameters and production analyze with the inoculated bacteria quantification on root.

Key words: *Azospirillum brasilense*, real time PCR, inoculants, and maize.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FENOLOGIA DO MILHO: ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA. FONTE: WEIDMANN, 2008.....	17
FIGURA 2 - EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE MILHO DE JANEIRO DE 2012 A JANEIRO DE 2015 EM TONELADAS.....	18
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS RECURSOS DE CUSTEIO DE LAVOURA A PRODUTORES E COOPERATIVAS PARA GRÃOS.....	19
FIGURA 4 – CROQUI DA DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS $T_{2014}N_0I^-$, $T_{2014}N_0I^{+5}$, $T_{2014}N_{50}I^-$, $T_{2014}N_{50}I^{+5}$ NAS PARCELAS DO CAMPO (EXPERIMENTO 2014).....	27
FIGURA 5 - CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO 2014 EM CAMPO. AS AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DO <i>AZOSPIRILLUM</i> BRASILENSE FORAM COLETADAS NOS DIAS APÓS A EMERGÊNCIA (DAE) INDICADOS NO CRONOGRAMA. PARA AS ANÁLISES BIOMÉTRICAS, AS COLETAS PARA ANÁLISES BIOMÉTRICAS FORAM REALIZADAS NOS DIAS MARCADOS COM “BIOMETRIA”.....	28
FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES 16S rRNA NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S DE <i>Azospirillum brasilense</i>	32
FIGURA 7 - HISTOGRAMA DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS 2012 E 2014.....	33
FIGURA 8 – ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PELOS INCIADORES IN SILICO REALIZADA COM A FERRAMENTA <i>Multiple Primer Analyzer</i> (www.lifetechnologies.com).....	36
FIGURA 9 - CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O INICIADOR Azo-2.....	39
FIGURA 10 – CURVA PADRÃO DE DNA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5. AS REAÇÕES FORAM PREPARADAS PARA UM VOLUME FINAL DE 20 μ L.....	41
FIGURA 11 – QUANTIFICAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PELO INCIADOR AzoR2.1 (EXPERIMENTO 2012).....	44
FIGURA 12 - VALORES DE C_t DAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO 2014. A LINHA VERMELHA INDICA O VALOR DE C_t DO LIMITE DE DETECÇÃO DA CURVA PADRÃO DE DNA (34,50) E A LINHA VERDE O VALOR DE C_t DA PLANTA SEM INOCULAÇÃO CULTIVADA EM CONDIÇÕES ESTÉREIS (37,77).....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 2 – ESTÁDIOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS ¹ DA PLANTA DE MILHO.....	16
TABELA 3 - INOCULAÇÃO DE MILHO COM AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO (EXPERIMENTO 2012).....	26
TABELA 4 - INOCULAÇÃO DE MILHO COM AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO (EXPERIMENTO 2014).....	27
TABELA 4 – INICIADORES UTILIZADOS NA qPCR.....	35
TABELA 6 - VALORES DE Ct PARA A AVALIAÇÃO DO PAR DE INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA.....	38
TABELA 1 - VALORES DE Ct PARA A CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O INICIADOR AZO-2.....	39
TABELA 8 – VALORES DE Ct PARA REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL EM REAÇÕES COM DIFERENTES VOLUMES UTILIZANDO O PAR DE INICIADORES AzoR2.1.....	40
TABELA 9 – VALORES DE Ct PARA A CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O PAR DE INICIADORES AzoR2.1.....	40
TABELA 10- DADOS BIOMÉTRICOS PARA EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE MILHO COM AS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7 DE AZOSPIRILLUM BRALISENE A CAMPO, CONDUZIDO EM 2012.....	42
TABELA 11 – DADOS REFERENTES À PRODUÇÃO PARA EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE MILHO COM AS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7 DE AZOSPIRILLUM BRALISENE A CAMPO, CONDUZIDO EM 2012.....	43
TABELA 12 – QUANTIFICAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 PELO INICIADOR AzoR2.1(EXPERIMENTO 2012).....	44
TABELA 13 - QUANTIFICAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 INOCULADO EM MILHO A CAMPO PELO PAR DE INICIADORES AzoR2.1 (EXPERIMENTO 2014).....	48
TABELA 14 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DNA E DA PLANTA CONTROLE.....	55
TABELA 15 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO EXPERIMENTO 2012.....	55

TABELA 16 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T2014N0I-.....	56
TABELA 17 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T2014N0I+5.....	57
TABELA 18 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T2014N50I-.....	58
TABELA 19 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T2014N50I+5.....	59
TABELA 20. VALORES DE Ct PARA AS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO 2014.	61
TABELA 21. ABRANGÊNCIA TAXONÔMICA DO PAR DE INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA.....	62

LISTA DE SIGLAS

CONAB	– Companhia Nacional de Abastecimento
Ct	– Cycle threshold (limiar do ciclo)
DAE	– Dia após a emergência
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
qPCR	– PCR quantitativa
UFC	– Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	14
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 CULTURA DO MILHO	16
4.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Azospirillum</i>	19
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DA PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 BACTÉRIAS E PREPARO DO INOCULANTE	24
5.2 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES COM <i>Azospirillum brasilense</i>	25
5.3 PLANTIO DAS SEMENTES	25
5.4 COLETA DAS AMOSTRAS	28
5.5 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA E DE PRODUÇÃO.....	29
5.6 CURVA PADRÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	30
5.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS A CAMPO	31
5.8 EXTRAÇÃO DO DNA.....	31
5.9 PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NA qPCR.....	31
5.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR qPCR.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 Extração do DNA	33
6.2 Avaliação dos iniciadores utilizados na qPCR	34
6.3 Experimento de inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> em milho a campo (2012).....	41
6.3.1 Avaliação Biométrica	41
6.3.2 Quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i> por qPCR	43
6.4 Experimento de inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> em milho a campo (2014).....	46
6.4.1 Avaliação Biométrica	47
6.4.2 Quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i>	47

7 CONCLUSÕES.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE.....	55

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é um dos principais cereais cultivados no mundo e o Brasil é o terceiro produtor mundial (6 a 7% da produção). Este cereal ocupa uma posição de destaque nas atividades agropecuárias do Brasil, sendo um insumo de destaque dos criadores de aves, suínos, bovinos e outros animais, compondo parcela majoritária das rações. O milho é produzido de norte a sul do Brasil, pois apresenta uma grande diversidade em relação às tecnologias e aos insumos utilizados, épocas de plantio, finalidades de uso e perfil socioeconômico do produtor.

Para melhorar a produtividade de algumas culturas, podem ser realizadas inoculações de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Estes organismos podem ser encontrados no gênero *Azospirillum* e tem sido extensivamente utilizadas como inoculantes de sementes para a fitoestimulação de culturas de cereais. As bactérias do gênero *Azospirillum* são fixadoras de nitrogênio de vida livre encontradas na rizosfera. Elas exibem um metabolismo versátil de carbono e nitrogênio, o que as torna bem adaptadas para se estabilizarem no competitivo ambiente da rizosfera. Elas podem utilizar como fonte de nitrogênio diversos compostos como: amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular.

O *Azospirillum* promove o crescimento da planta, especialmente do sistema de raiz, aumentando a captação de água e nutrientes. Nem sempre a bactéria sobrevive bem no solo ou rizosfera e isto pode afetar o desempenho do inoculante. A associação entre a planta e *Azospirillum* é bem sucedida somente quando a bactéria é capaz de sobreviver no solo e se atingir uma população significativa no sistema radicular da planta hospedeira. Por muito tempo os métodos para a quantificação de bactérias no sistema radicular foram ineficientes, não sendo possível explicar os casos de falha na promoção do crescimento proporcionada por bactérias promotoras do crescimento vegetal.

A técnica de PCR quantitativa é uma abordagem promissora para quantificar populações bacterianas em ambientes complexos. Recentemente, a PCR em tempo real tem sido o método escolhido para quantificar populações da rizosfera porque permite alta especificidade, sensibilidade e velocidade.

Em 2009, Couillerot e colaboradores desenvolveram um método de PCR em tempo real para a quantificação de *Azospirillum lipoferum* CRT1 na rizosfera de

milho. Este experimento foi validado pela significativa correlação com contagem de colônias; por sua capacidade de obter a população estimada de inoculantes de rizosfera não esterilizada em vasos e pela comparação com dados de literatura anteriores de experimentos em campo, concluindo que esta abordagem é recomendada como ferramenta para a quantificação de inoculantes de *Azospirillum* em solo e rizosfera.

Em 2013, Stets desenvolveu iniciadores estirpe-específicos para a quantificação de *Azospirillum brasilense* FP2. Os iniciadores obtidos neste estudo foram testados em experimentos com trigo em casa de vegetação e os resultados mostraram níveis de *Azospirillum brasilense* FP2 em 10^7 UFC/ g raiz. Este nível foi confirmado pela contagem de colônias pelo método tradicional em placa, confirmando que os iniciadores são eficientes para a quantificação desta bactéria promotora do crescimento vegetal.

A metodologia da PCR em tempo real foi utilizada no presente trabalho a fim de verificar e quantificar a permanência das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* inoculado em sementes de milho plantadas a campo sob diferentes regimes de adubação nitrogenada.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar iniciadores utilizados para a quantificação de bactérias e quantificar a persistência da população de estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculado em sementes de milho plantadas no campo sob diferentes regimes de adubação nitrogenada, através da abordagem de PCR em tempo real quantitativa (qPCR).

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Validar pares de iniciadores para quantificação de bactérias totais, *Azospirillum* spp. e *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7;
- b) Construir a curva de calibração a partir da mistura dos DNA de plantas de milho e de *Azospirillum brasilense* Ab-V5;
- c) Extrair o DNA das amostras de raízes de milho a partir de experimentos de inoculação com as estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio a campo;
- d) Quantificar a população das estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculadas em raízes de milho por PCR em tempo real quantitativa (qPCR).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 CULTURA DO MILHO

O milho, *Zea mays* L., é uma gramínea pertencente a família Poaceae. É uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia, devido à sua grande capacidade de acumulação de fotoassimilados. O período de cultivo é relativamente curto e países tropicais, como o Brasil, possuem grande vantagem quando comparados a países de clima temperado.

O desenvolvimento desta planta é dividido em estádios vegetativo (V) e reprodutivo (R), mostrados na tabela 1 e figura 1. Todas as plantas seguem o mesmo padrão, entretanto, o tempo específico entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas varia entre os diferentes híbridos, ano agrícola e data e local de plantio. Durante a fase vegetativa, cada estágio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo. Estas considerações se referem ao genótipo normal do milho, no qual a floração ocorre 65 dias após a emergência (EMBRAPA).

TABELA 2 – ESTÁDIOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS¹ DA PLANTA DE MILHO.

VEGETATIVO	REPRODUTIVO
Emergência (V _E)	Embonecamento (R ₁)
Estádio (V ₁)	Bolha D'água (R ₂)
Estádio (V ₂)	Leitoso (R ₃)
Estádio (V ₃)	Pastoso (R ₄)
Estádio (V _n)	Formação de Dente (R ₅)
Pendoamento (V _T)	Maturidade Fisiológica (R ₆)

¹As subdivisões dos estádios vegetativos são designadas numericamente como V₁, V₂ até V_n, onde (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento.

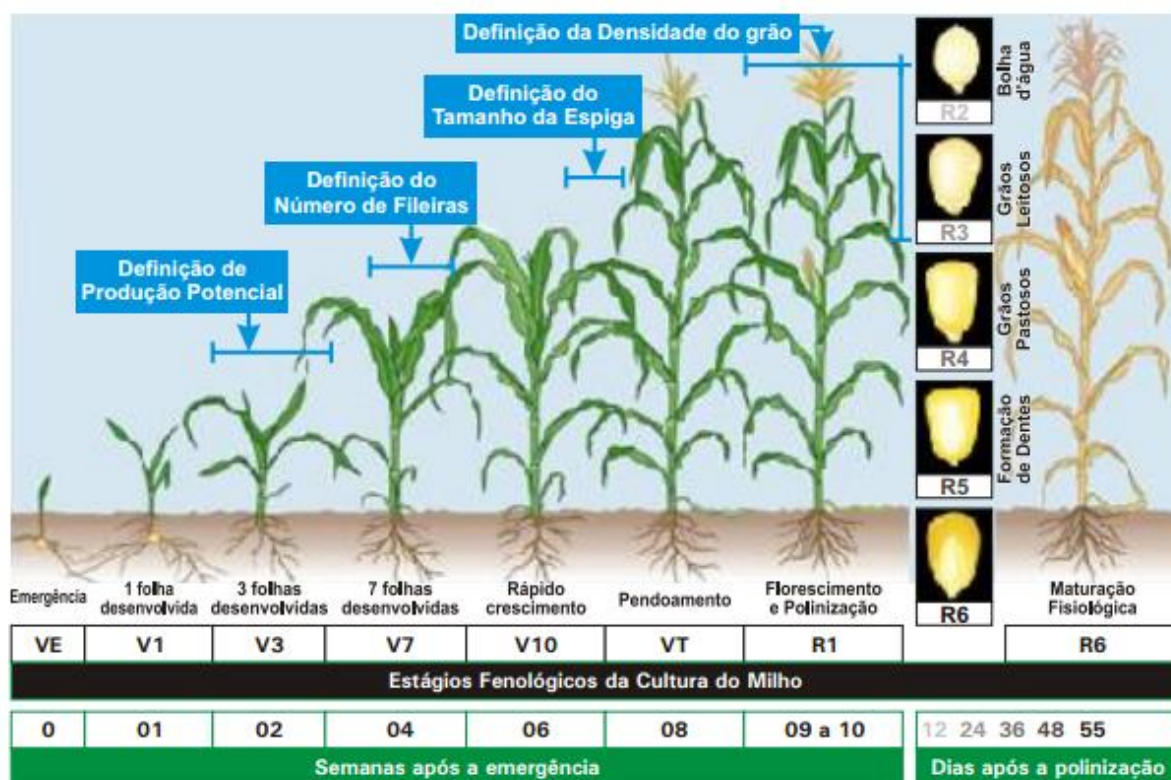


FIGURA 1 – FENOLOGIA DO MILHO: ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA. FONTE: WEIDMANN, 2008.

Nacionalmente a Região Centro-oeste é a maior produtora de milho, apresentando um total de 34.553,1 mil toneladas na safra de 2014/2015, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor da região, com 17.673,4 mil toneladas. A Região Sul é a segunda maior produtora deste grão, com 22.964,9 mil toneladas na mesma safra, dentro dela o estado de destaque é o Paraná (14.562,6 mil t). A região de menor destaque na produção de milho é a Norte com uma produção de 1.851,2 mil toneladas na safra 2014/2015 (CONAB – boletim de grãos de fevereiro de 2015).

No Brasil, no que se refere à disponibilidade de milho para os principais mercados consumidores, como setores de aves e suínos, a situação de oferta e demanda é bastante confortável. Mesmo com a boa exportação na safra de 2013/2014, os estoques finais ficaram em 14,3 milhões de toneladas, aumentando a disponibilidade interna do grão no primeiro semestre de 2014, mesmo com a queda da produção do milho na primeira safra. Sobre o consumo interno, também projeta-se um incremento de 53,9 a 55 milhões de toneladas no consumo deste grão. Esta tendência foi observada porque setor de produção animal tem projetado um

crescimento no plantel, já que as oportunidades de mercado deste setor estão favoráveis (CONAB – boletim de grãos de fevereiro de 2015).

No que se refere ao mercado externo, as exportações brasileiras fecharam o ano safra (fevereiro de 2014 a janeiro de 2015) em 20,9 milhões de toneladas, 400 mil toneladas a mais do projetado no último relatório, feito em fevereiro de 2014. O panorama de exportação do milho pode ser visualizado na figura 2 (CONAB – boletim de grãos de fevereiro de 2015).

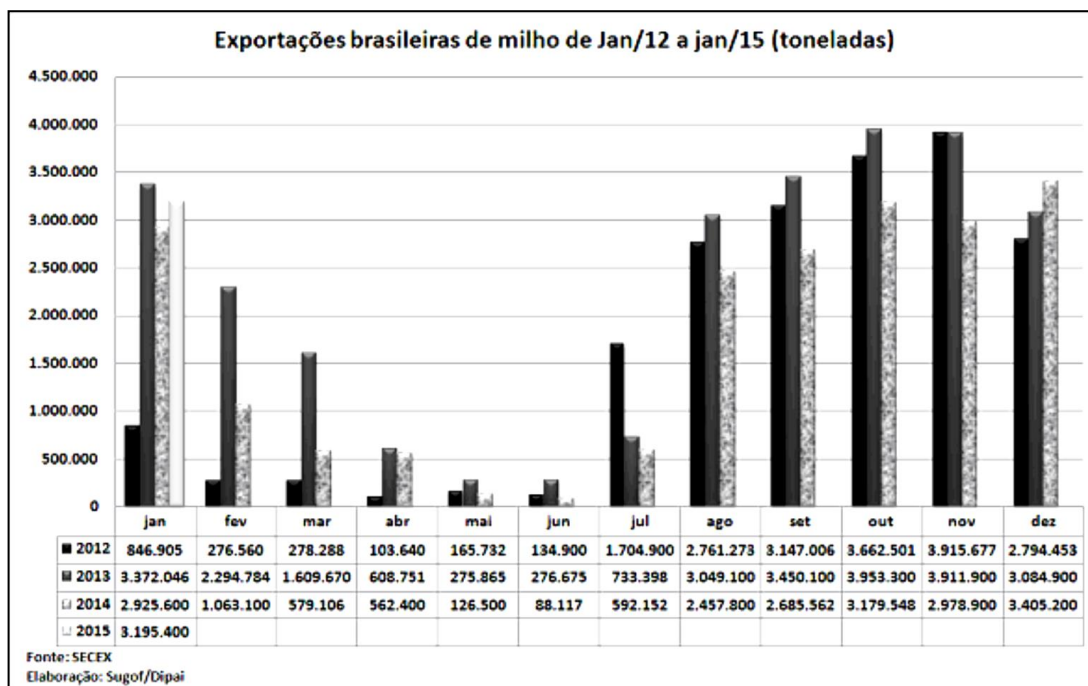


FIGURA 2 - EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE MILHO DE JANEIRO DE 2012 A JANEIRO DE 2015 EM TONELADAS.

O milho é a cultura que absorve a maior parcela dos financiamentos destinados ao crédito rural disponibilizado pelas instituições financeiras, como mostra a figura 3.

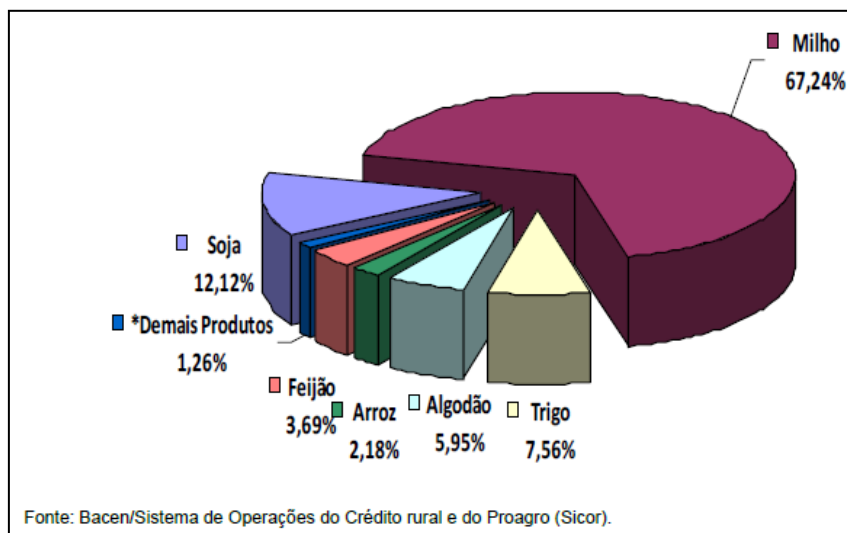


FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS RECURSOS DE CUSTEIO DE LAVOURA A PRODUTORES E COOPERATIVAS PARA GRÃOS.

4.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Azospirillum*

A produtividade de algumas culturas pode ser melhorada com a inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento. Estes organismos podem ser encontrados no gênero *Azospirillum* e tem sido extensivamente utilizadas como inoculantes de sementes para a fitoestimulação de culturas de cereais (PEDRAZA et al., 2009).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são α -proteobactérias gram-negativas. Elas já foram isoladas da rizosfera de muitas gramíneas e cereais por todo o mundo em locais de clima tropical e temperado. Estes organismos apresentam um metabolismo de carbono e nitrogênio versátil, o que os torna estáveis e bem adaptados ao competitivo ambiente da rizosfera. Em condições desfavoráveis, o *Azospirillum* pode se converter em forma de cisto (LAMM e NEYRA, 1981). Sob dessecação ou limitação de nutrientes, ocorre o desenvolvimento de um revestimento externo de polissacarídeos e a acumulação de grânulos de poli- β -hidroxibutirato, que servem como fonte de energia e carbono (TAL e OKON, 1985). Estas bactérias também são conhecidas por serem fixadoras de nitrogênio de vida livre. Elas podem converter o nitrogênio atmosférico em amônia sob condições microaeróbicas e em baixos níveis de nitrogênio através do complexo da nitrogenase.

O gênero *Azospirillum* é normalmente considerado como bactéria de rizosfera, porém apresenta diferenças espécie-específicas na maneira de colonizar as raízes. A ligação da bactéria a raiz é fundamental para uma associação eficiente com o hospedeiro. Foi demonstrado que este processo apresenta duas fases. No primeiro momento, a bactéria adsorve às raízes como célula individual de uma maneira rápida, fraca e reversível. Na segunda fase ocorre a ancoragem, na qual são formados agregados de bactérias que se ligam firmemente a raiz de maneira irreversível (STEENHOUDT, 2000).

O *Azospirillum* promove o crescimento da planta, especialmente do sistema de raiz, aumentando a captação de água e nutrientes (OKON e KAPULNIK, 1986; JACOUD et al, 1999). Um dos principais mecanismos da promoção do crescimento está relacionado à sua capacidade de produzir substâncias promotoras do crescimento de plantas (OKON, 1994). Vários modos de ação foram documentados para *Azospirillum*, entre eles está a produção de fitormônios como auxinas, que são frequentemente propostos como o principal mecanismo de estimulação do sistema de raiz (DOBBELAERE, 2003). Os compostos relacionados ao metabolismo no nitrogênio também tem uma importante função. A produção de óxido nítrico influencia no crescimento da planta, pois age como molécula sinalizadora na cascata de hormônios responsável pela formação da raiz (CREUS et al., 2005). Além disso, *Azospirillum* também produz enzimas com a atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, responsável pela degradação do ACC (precursor do etileno) em amônia e α -cetobutirato, promovendo o crescimento da planta através da redução dos níveis de etileno (PRIGENT-COMBARET et al., 2008).

Devido a estas características o *Azospirillum* pode ser utilizado como inoculante em algumas culturas. Para o milho foi verificado que o nível de inoculação encontrado nas plantas após 14 dias ideal seria de 10^7 UFC por raiz e acima de 10^9 uma clara inibição é observada (ARSAC, 1990). Enquanto que para o trigo este nível está entre 10^5 e 10^6 (KAPULNIK, 1985).

Na rizosfera um gradiente decrescente de nutrientes da raiz para o solo ao redor é gerado pelos exsudatos da raiz da planta. A motilidade e quimiotaxia permitem que a bactéria se mova em direção a raiz da planta onde pode se beneficiar dos exsudatos como fonte de energia e carbono, e assim contribuem para a sobrevivência e colonização da rizosfera (STEENHOUDT, 2000). A associação

Azospirillum-raiz da planta somente é bem sucedida se a bactéria é capaz de sobreviver no solo e se atingir uma população significativa no sistema radicular da planta hospedeira (STEENHOUDT, 2000). Por muito tempo os métodos para verificar a eficácia da colonização das raízes foram ineficientes, tanto os dependentes como os independentes de cultivo, e desta maneira os casos de falha de inoculação permanecem inexplicados (COUILLEROT et al., 2009).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ATRAVÉS DA PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A técnica de PCR quantitativa é uma abordagem promissora para quantificar populações bacterianas em ambientes complexos. Recentemente, a PCR em tempo real tem sido o método escolhido para quantificar populações da rizosfera porque permite alta especificidade, sensibilidade e velocidade (SØRENSEN et al., 2009; COUILLEROT et al., 2009).

A quantificação por esta técnica pode ser feita utilizando o fluoróforo SYBR green, que possui afinidade por moléculas de DNA em dupla fita. Quando estas moléculas são formadas durante a etapa de extensão pela Taq DNA polimerase no processo de amplificação por PCR, a molécula de SYBR green se liga às moléculas de DNA e sua fluorescência é aumentada. Quando o DNA é desnaturado no próximo ciclo, o corante é dissociado, e sua fluorescência diminui drasticamente. Ao final de cada ciclo estes valores de fluorescência são gravados e representam a quantidade de produto amplificado, pois esta metodologia em acompanhar o número de cópias de um fragmento de DNA produzido na reação de PCR a cada ciclo.

A curva de amplificação por PCR em tempo real apresenta três fases distintas: i) linha basal, onde não há produtos de PCR suficientes para detectar a fluorescência; ii) fase log, onde a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e iii) fase platô, onde não mais aumento no número de produtos de PCR. Uma vez feita a amplificação, é traçada uma linha na fase log para determinar em qual ciclo cada amostra atinge este limiar, este ciclo é chamado de *CycleTreshold* (Ct). Este valor de Ct permite a comparação entre amostras e é proporcional a concentração de DNA da amostra. Os valores de Ct de amostras com concentração de DNA

conhecida são utilizados para a construção de uma curva padrão de DNA que permitirá a quantificação de amostras desconhecidas.

Em 2010, Couillerot e colaboradores quantificaram as estirpes UAP-154 e CFN-535 de *Azospirillum brasilense* em milho. Neste estudo, iniciadores foram desenvolvidos a partir de marcadores de regiões amplificadas, posteriormente sequenciadas e caracterizadas, sem nenhuma similaridade nos bancos de dados. Os marcadores foram obtidos a partir de ampliações por BOX, ERIC e RAPD de diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*. No monitoramento das estirpes UAP-154 e CFN-535, a 10 dias de crescimento, foram observados 3×10^6 e 1×10^6 UFC por sistema radicular $4,9 \times 10^5$ e $1,9 \times 10^5$ UFC.g raiz⁻¹, respectivamente.

Couillerot e colaboradores (2010) também desenvolveram um método de PCR em tempo real para a quantificação de *Azospirillum lipoferum* CRT1 na rizosfera de milho em condições de casa de vegetação. Neste trabalho ocorreu um grande esforço para obtenção de especificidade de detecção e eficiência de amplificação. Os iniciadores utilizados foram selecionados dentro de uma região estirpe específica do genoma de *Azospirillum lipoferum* CRT1 obtida por RFLP. Este experimento foi validado pela significativa correlação com contagem de colônias; por sua capacidade de obter a população estimada de inoculantes de rizosfera não esterilizada em vasos e pela comparação com dados de literatura anteriores de experimentos em campo, concluindo que esta é uma abordagem recomendada como ferramenta para a quantificação de inoculantes de *Azospirillum* em solo e rizosfera. Neste trabalho foi verificada a presença do *Azospirillum lipoferum* CRT1 em níveis que variaram de 3×10^4 a 3×10^8 UFC.g raiz⁻¹.

Stets (2013) utilizou a metodologia da PCR quantitativa para a quantificação de *Azospirillum brasilense* FP2 em trigo inoculado em condições de casa de vegetação. Neste estudo foram desenvolvidos iniciadores estirpe-específicos para o *Azospirillum brasilense* FP2. Eles foram construídos através da fragmentação, *in silico*, da sequência genômica da estirpe FP2 em regiões de 500pb, as quais foram utilizadas para a comparação com sequências depositadas em bancos de dados. As sequências com identidade inferior a 6% com as sequências do banco de dados foram selecionadas para a construção dos iniciadores resultando em cinco pares de iniciadores específicos para o *Azospirillum brasilense* FP2. Sob condições estéreis e não estéreis, as bactérias apresentaram níveis entre 10^7 e 10^8 UFC.g raiz⁻¹. Este

resultado foi confirmado pela contagem de bactérias pelo método tradicional em placa.

Pereira (2014) utilizou esta ferramenta para a quantificação de *Hebaspirillum seropedicae* SmR1 em milho. Neste trabalho os iniciadores foram desenhados especificamente para duas regiões encontradas com cópia única no genoma da bactéria e a especificidade foi confirmada por análises de alinhamento *in silico* contra banco de dados públicos de sequências de DNA. Os experimentos foram realizados *in vitro* e em casa de vegetação. O número estimado de células de bactéria no experimento variou de 10^7 a 10^9 UFC.g raiz⁻¹ e para a casa de vegetação o nível de *Hebaspirillum seropedicae* SmR1 ficou na ordem de 10^6 UFC. g raiz⁻¹.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste trabalho provêm de dois experimentos de campo independentes, realizados na estação Experimental “Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Marechal Cândido Rondon. O primeiro experimento foi conduzido em outubro de 2012 (identificado como "experimento 2012") e o segundo em março de 2014 (identificado como "experimento 2014").

5.1 BACTÉRIAS E PREPARO DO INOCULANTE

Para o experimento 2012 os inoculantes foram preparados no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná pela Dra. Luiza Araújo. Os inoculantes das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* foram preparados separadamente a partir de uma solução pura na concentração de 1×10^9 UFC.mL⁻¹.

As estirpes de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas em meio líquido NFbHPN (DÖBEREINER, 1980) contendo 5 mmol.L⁻¹ de glutamato como fonte de carbono a 30°C até uma DO₆₀₀ entre 1,5 e 1,8 (cerca de 48 h de crescimento) que corresponde a aproximadamente 10^9 UFC.mL⁻¹ de inoculante. Neste caso, foi mantida a relação 1:5 (volume de meio de cultura:volume do frasco) e a essa cultura foi adicionado polivinilpirrolidona (PVP) 0,5%.

Para o cálculo da viabilidade das células e determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), as culturas crescidas foram diluídas serialmente até a diluição de 10^{-7} , plaqueadas nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e contadas pela técnica de micro gota.

Para as amostras 2014 foi utilizado como inoculante apenas a estirpe de *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Este inoculante também foi preparado no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná pela Dra. Luiza Araújo nas mesmas condições dos inoculantes preparados para o experimento 2012.

5.2 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES COM *Azospirillum brasilense*

Para as amostras 2012, na inoculação individual das estirpes de *Azospirillum brasilense* foram utilizados 6 mL de inoculante para 1.000 sementes de milho. Na inoculação combinada entre duas estirpes foram utilizados 3 mL da solução de cada estirpe e na inoculação com as três estirpes, 2 mL de cada solução foram utilizados. A inoculação foi realizada 2 horas antes da semeadura. O híbrido de milho utilizado foi o 30F53.

A inoculação das sementes da amostra 2014 foi realizada com um inoculante comercial a base da estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* na proporção de 4mL do inoculante para 1.000 sementes de milho. Como controle, foram aplicados 4 mL de água para 1.000 sementes. As sementes foram deixadas em descanso por 24 horas. O híbrido de milho utilizado foi o DKB-240 VTPRO.

5.3 PLANTIO DAS SEMENTES

Ambos os experimentos foram executados em colaboração com a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) na Estação Experimental “Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon – PR, localizado a 54° 22' W, 26° 46' S e altitude média de 420 metros. Os experimentos foram realizados em sistema de plantio direto sobre a palhada da cultura da soja em solo argiloso, classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico.

O delineamento experimental utilizado para as amostras 2012 foi de blocos ao acaso, com quatro blocos para cada um dos dez tratamentos (tabela 2). Os diferentes blocos de campo receberam três tratamentos para adubação nitrogenada (N): 0 kg.ha⁻¹ (0%), 60 kg.ha⁻¹ (50%) e 120 kg.ha⁻¹ (100%). A adubação de 120 kg.ha⁻¹ é aquela recomendada para a cultura de milho pela EMBRAPA. A adubação nitrogenada foi dividida em três aplicações conforme a necessidade de cada tratamento, sendo 40% aplicados na semeadura e o restante aplicado em cobertura, em partes iguais, nos estádios vegetativos V4 e V6.

A semeadura foi realizada no dia 10 de outubro de 2012 com o auxílio de semeadora manual (matracas), distribuindo-se cinco sementes por metro no sulco

de semeadura. Cada parcela experimental foi constituída de seis linhas de 0,7 m de espaçamento com 5,0 m de comprimento e 3,5 m de largura, totalizando 17,5 m². Foram realizadas duas aplicações de inseticidas para o controle de pragas, a primeira quando as plantas se encontravam no estágio V1 e a segunda no estágio V3.

TABELA 3 - INOCULAÇÃO DE MILHO COM *AZOSPIRILLUM* BRASILENSE AB-V5 EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO (EXPERIMENTO 2012).

TRATAMENTO	DOSE DE NITROGÊNIO / INOCULAÇÃO
$T_{2012}N_0I^-$	0 N / sem inoculação
$T_{2012}N_{50}I^-$	50% N / sem inoculação
$T_{2012}N_{100}I^-$	100% N / sem inoculação
$T_{2012}N_{50}I^{+5}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5
$T_{2012}N_{50}I^{+6}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6
$T_{2012}N_{50}I^{+7}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V7
$T_{2012}N_{50}I^{+56}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6
$T_{2012}N_{50}I^{+57}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V7
$T_{2012}N_{50}I^{+67}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6 e Ab-V7
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	50% N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7

As sementes de milho para as amostras 2014 com ou sem inoculantes foram plantadas em quatro linhas com espaçamento de 0,5 m dentro de parcelas que apresentavam 5,0 m de comprimento por 2,0 m de largura, totalizando 10 m². Os tratamentos podem ser visualizados na tabela 3 e o croqui na figura 4. A adubação nitrogenada foi realizada a lanço após a semeadura. A semeadura da cultura do milho foi realizada no dia 26 de março de 2014 e após seis dias as plantas emergiram. No primeiro, sétimo e décimo quarto dias após emergência (DAE) das plantas houve aplicação de inseticida para controle de percevejos. Ocorreu chuva em três dias durante o experimento. O cronograma do experimento de campo pode ser visualizado na figura 5.

TABELA 4 - INOCULAÇÃO DE MILHO COM AZOSPIRILLUM BRASILENSE AB-V5 EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO (EXPERIMENTO 2014).

TRATAMENTO	DOSE DE NITROGÊNIO / INOCULAÇÃO
$T_{2014}N_0I^-$	0 N / sem inoculação
$T_{2014}N_0I^{+5}$	0 N / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5
$T_{2014}N_{50}I^-$	50%N / sem inoculação
$T_{2014}N_{50}I^{+5}$	50% / inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5

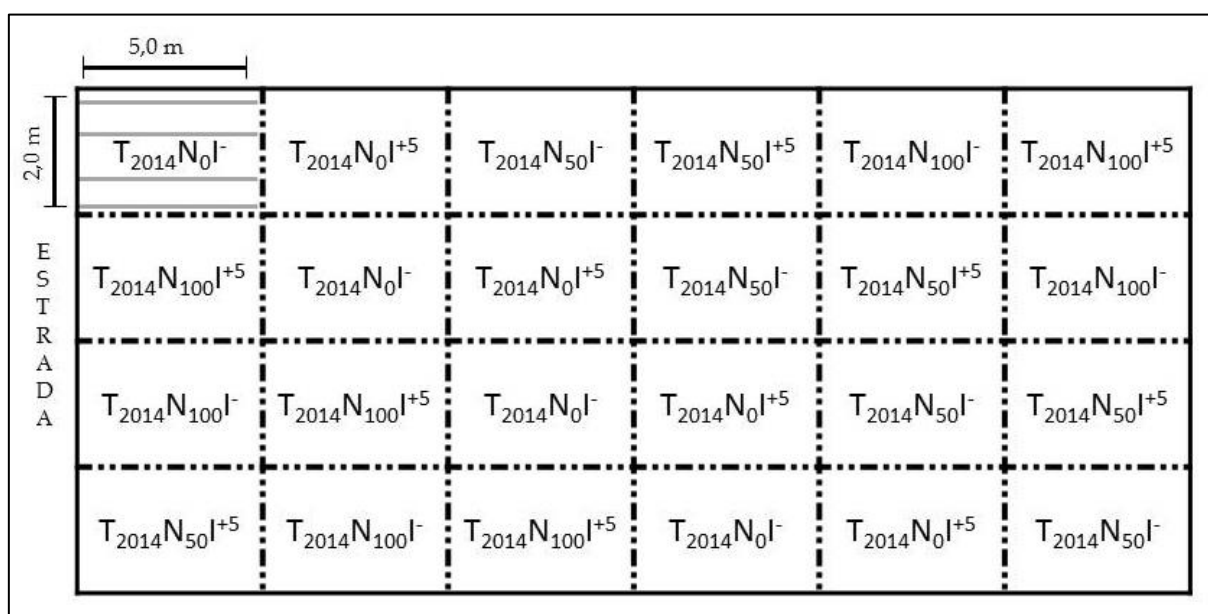


FIGURA 4 – CROQUI DA DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS $T_{2014}N_0I^-$, $T_{2014}N_0I^{+5}$, $T_{2014}N_{50}I^-$, $T_{2014}N_{50}I^{+5}$ NAS PARCELAS DO CAMPO (EXPERIMENTO 2014).

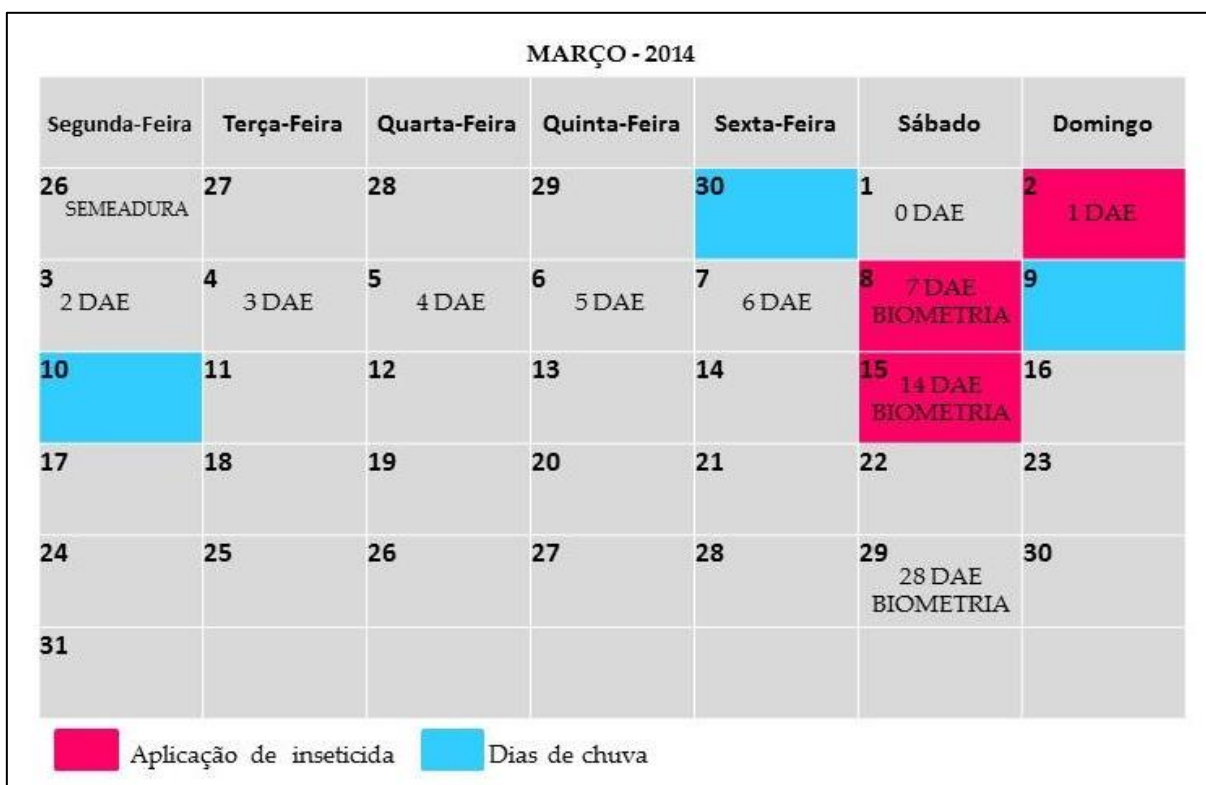


FIGURA 5 - CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO 2014 EM CAMPO. AS AMOSTRAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DO *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* FORAM COLETADAS NOS DIAS APÓS A EMERGÊNCIA (DAE) INDICADOS NO CRONOGRAMA. PARA AS ANÁLISES BIOMÉTRICAS, AS COLETAS PARA ANÁLISES BIOMÉTRICAS FORAM REALIZADAS NOS DIAS MARCADOS COM "BIOMETRIA".

5.4 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta e avaliações biométricas do experimento 2012 foram realizadas no estágio vegetativo com oito folhas totalmente expandidas (V8), sendo retiradas três plantas de forma aleatória dentro da área útil de cada parcela. Para a quantificação das estirpes Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* a coleta foi realizada em duplicata, a partir de duas parcelas de cada tratamento, colhendo-se 3 plantas de cada parcela. Neste experimento, também foi realizada uma coleta no dia 14 de fevereiro para análise dos componentes da produção. Dez espigas de cada parcela foram coletadas aleatoriamente.

Para o experimento 2014, a coleta das plantas para quantificação de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 foi realizada nos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 14º e 28º DAE (FIGURA 5). Esta coleta foi realizada em triplicata, a partir de três parcelas de cada tratamento, colhendo-se 3 plantas de cada parcela. A coleta das plantas para

as análises biométricas foi realizada nos 7º, 14º e 28º DAE (FIGURA 5), nos estádios fenológicos V4, V7 e V10, respectivamente. Para os 7º e 14º DAE foram coletadas cinco plantas por parcela e para o 28º DAE três plantas.

5.5 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA E DE PRODUÇÃO

As coletas para avaliações biométricas e de produção foram realizadas pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os parâmetros avaliados estão listados abaixo, por categoria.

1. Dados Biométricos

1.1. Parte Aérea

1.1.1. Massa seca da parte aérea (MSPA)

1.1.2. Comprimento da parte aérea (CPA)

1.1.3. Massa seca de parte aérea (MSPA)

1.2. Folha

1.2.1. Área foliar (AF)

1.2.2. Número de folhas (NF)

1.2.3. Massa seca das folhas (NF)

1.3. Colmo

1.3.1. Diâmetro basal do colmo (DC)

1.3.2. Massa seca do colmo (MSC)

1.4. Raiz

1.4.1. Comprimento de raiz (CR)

1.4.2. Comprimento de raiz nodais (CRA)

1.4.3. Comprimento total (CT)

1.4.4. Número de raiz (NR)

1.4.5. Volume de raiz (VR)

1.4.6. Número de raiz nodais (NRA)

1.4.7. Volume de raiz nodais (VRA)

1.4.8. Massa seca da raiz (MSR)

1.5. Outros

1.5.1. Índice SPAD

1.5.2. Massa seca total (MST)

2. Dados de Produção

2.1. Comprimento da espiga (CE)

2.2. Número de fileiras de grãos por espiga (NFE)

2.3. Número de grãos por fileira (NGF)

2.4. Massa de mil grãos (MMG)

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Sisvar (Ferreira, 2011) e GENES (Cruz, 2006), de modo que os dados foram submetidos à análise de variância e, no caso de efeito significativo, utilizou-se o teste F ou o teste Tukey a 5% de probabilidade para a diferenciação das médias. Realizou-se ainda a correlação de Pearson entre os parâmetros fisiológicos avaliados.

5.6 CURVA PADRÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* Ab-V5

A curva padrão foi construída, conforme COUILLEROT et al. (2009), para simular as condições encontradas durante a extração do DNA das plantas inoculadas. Tubos com 40 mg de raiz de milho triturada foram inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 para alcançar 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC).

Para a obtenção de DNA das plantas, nesta etapa, sementes de milho foram esterilizadas e plantadas em tubos estéreis. Elas foram esterilizadas com hipoclorito 6%, tween 20 e água destilada estéril por 20 minutos na proporção de 1 mL por semente. Em seguida esta solução foi dispensada e as sementes ficaram em etanol 70% por 5 minutos, o etanol foi dispensado e uma solução com antifúngico foi adicionada, onde as sementes ficaram por 4 horas. As sementes foram lavadas quatro vezes em água destilada estéril e colocadas para germinar em ágar água 0,7% por 2 dias. As sementes germinadas foram transferidas para tubos contendo 25 mL de *plant medium* (EGENER, 1999) e pérolas de quartzo, onde cresceram por sete dias. No sétimo dia as plantas foram coletadas e a raiz foi selecionada para trituração em nitrogênio líquido. Amostras de 40 mg desta raiz triturada foram colocadas em microtubos para posteriormente serem misturadas com as diluições da cultura de *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

A cultura de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 foi obtida de um estoque em placa, do qual foi feito um pré-inóculo, crescido durante a noite, e então 1 mL deste pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de NFb, contendo lactato como fonte de carbono, que ficou sob agitação a 30°C por aproximadamente 36 horas. Esta cultura foi diluída na razão de 1/10, oito vezes, e 100 µL de cada diluição foram misturados a 40 mg de raiz triturada e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos, para propiciar as interações entre as partículas da raiz e a bactéria e então o DNA desta mistura foi extraído. Ao mesmo tempo 100 µL de cada diluição foram plaqueados para fazer a contagem das bactérias 48 horas depois através da técnica da micro gota (ROMEIRO, 2012).

5.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS A CAMPO

As amostras de campo foram coletadas e as raízes foram selecionadas, armazenadas em *RNA later* (Sigma) e congeladas. As raízes foram secadas em papel filtro, pesadas e trituradas em nitrogênio líquido com pistilo. Um total de 100 mg foram selecionados para as amostras 2012 e 40 mg para as amostras 2014 e colocados em microtubos. O restante de cada amostra foi pesado e também armazenado em microtubos. Esta raiz triturada foi então congelado a -80°C para ser utilizada na extração do DNA.

5.8 EXTRAÇÃO DO DNA

A mistura de 40 mg de raízes de milho triturada e cultura de *Azospirillum brasilense* Ab-V5, feita como descrito no item 5.6., foi utilizada para extração do DNA na construção da curva padrão com o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Para as amostras de campo, a quantidade de raiz utilizada para a extração dependeu do kit utilizado: a) experimento 2012, 100 mg de raiz triturada extraídos com o *Kit Power Plant* (MoBio) e; b) experimento 2014, 40 mg de raiz triturada extraídos com o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Ambos os kits permitem a extração de DNA de planta e de bactérias.

5.9 PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NA qPCR

Três iniciadores foram selecionados para a quantificação dos organismos nas amostras: 16S rRNA, Azo-2 e AzoR2.1, para a quantificação de bactérias totais, de organismos da espécie *Azospirillum brasilense* e das estirpes *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7, respectivamente. O iniciador 16S rRNA foi cedido pelo Prof. Dr. Doumit Camilios Neto (Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR). Este iniciador permite a amplificação de cerca de 70 bases na extremidade 3' do gene 16S rRNA de bactérias pertencentes a variados filos (tabela 20) e é mostrado na figura 6.

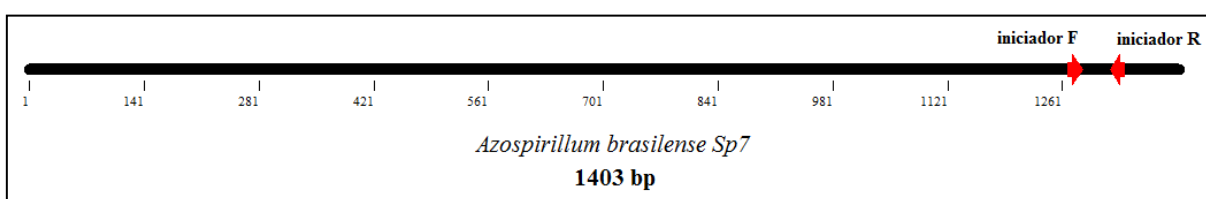


FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES 16S rRNA NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S DE *Azospirillum brasilense*.

5.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR qPCR

As reações de PCR quantitativa foram conduzidas no equipamento Step One Plus Real-time PCR (Applied Biosystemns). A reação de qPCR continha 10 µL da solução mix do kit SYBR green (Applied Biosystemns) na concentração 2x, 6 µL de DNA e 4 µL do iniciador, nas concentrações adequadas determinadas experimentalmente (ver Resultados). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de duas temperaturas: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguido de uma curva de desnaturação. Para todas as amostras foram feitas triplicatas técnicas nas placas de PCR quantitativa.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração do DNA

Para o experimento 2012 amostras foram extraídas com o *Kit Power Plant* (MoBio) e as concentrações obtidas variaram de 24,00 a 52,35 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. No experimento 2014 foi utilizado o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e as concentrações variaram de 2,57 a 95,87 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A variação das concentrações é mostrada no histograma da figura 7, a maioria das amostras apresentou concentração entre 6,0 e 10,9 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Os valores de concentração obtidos no NanoDrop (Thermo Scientific), o peso de raiz triturada utilizada para a extração e as diluições obtidos para cada amostra são mostrados nas tabelas 13 a 18.

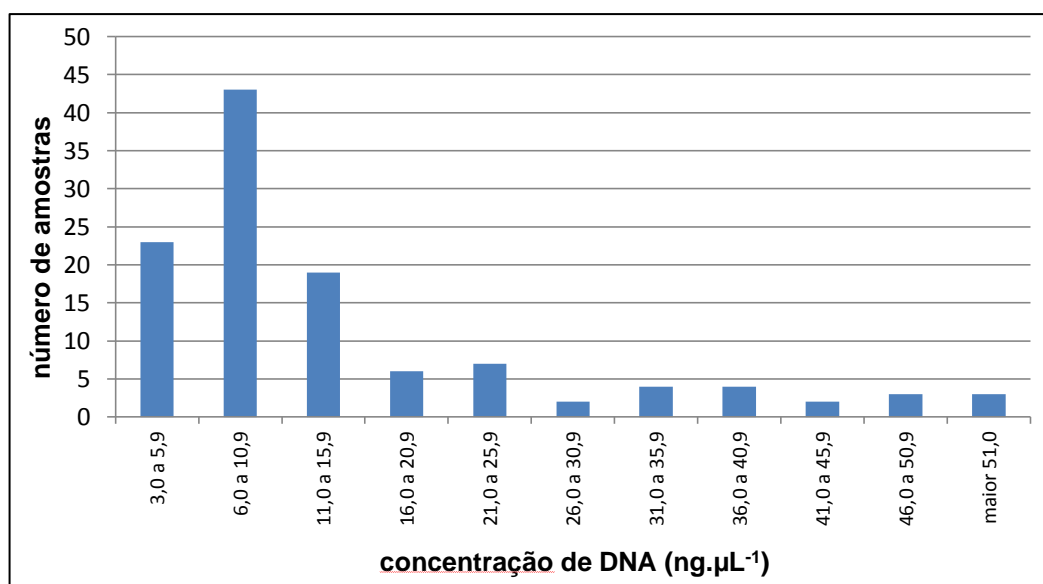


FIGURA 7 - HISTOGRAMA DA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS 2012 E 2014.

A concentração de todas as amostras foi então padronizada para 2,57 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ($T_{2014}N_{100}I^{-5}$), a menor concentração obtida nas extrações de DNA. Esta etapa foi necessária, pois durante a extração de DNA, são extraídos tanto o DNA da planta como o da bactéria. Apesar de os iniciadores serem desenhados especificamente para a bactéria, o DNA de planta existente na amostra pode interferir na PCR quantitativa. Quando se iguala a concentração de todas as amostras, a proporção entre o DNA de bactéria e o DNA de planta, na amostra original, é mantida e a

variação de DNA da bactéria alvo é interna. Desta forma a quantificação fica mais próxima da realidade, sem superestimar ou subestimar o número de bactérias.

A curva padrão contendo diferentes proporções de DNA da planta e da bactéria foi construída também na concentração de DNA final de $2,57 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ e os valores de Ct obtidos foram proporcionais à quantidade de bactéria misturada a raiz de planta (figura 10 e tabela 8), indicando que esta concentração não foi limitante para a quantificação por qPCR.

6.2 Avaliação dos iniciadores utilizados na qPCR

Para quantificação das bactérias associadas às raízes de milho, foram utilizados três pares de iniciadores (tabela 4). O par de iniciador AzoR2.1 é estirpe-específico e foi usado na quantificação de *A. brasilense* Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7; o par de iniciador Azo2 é espécie-específico e foi usado na quantificação de *Azospirillum* spp.; e o par de iniciador para amplificação do gene 16S rRNA foi usado na quantificação de bactérias totais. A possível formação de estruturas secundárias pelos iniciadores, o que pode interferir na amplificação e quantificação, foi avaliada através do programa *Multiple Primer Analyzer* (Life Technologies - www.lifetechnologies.com) e é mostrada na figura 8. A formação de estruturas secundárias não ocorre para nenhum dos iniciadores no critério de sensibilidade 3, o qual é considerado ótimo. Este critério de sensibilidade varia de 1 a 10, sendo 1 o valor de sensibilidade de detecção máximo. Quando os iniciadores são analisados na sensibilidade 2, todos apresentam a formação de dímeros. O par de iniciadores AzoR2.1 apresenta formação de um dímero para o iniciador F; enquanto o par de iniciadores Azo2 apresenta formação de dois dímeros, um para o iniciador R e outro para o par de iniciadores; para o par de iniciadores 16S rRNA um dímero é formado para o iniciador F. Através da análise dos iniciadores pelo critério de sensibilidade 1, mais rigoroso, foi verificada a formação de mais dímeros para os iniciadores Azo2 e para 16S rRNA. Além dos dímeros já formados, o par de iniciadores Azo 2 apresentou a formação de um dímero para o iniciador R e outro para o par de iniciadores. Para o 16S rRNA ambos os dímeros formados são para o iniciador F. A informação fornecida por esta análise é utilizada como um guia preliminar para a seleção de combinação de iniciadores apropriada. Durante a reação de amplificação efetiva a formação de dímeros pode variar de acordo com as condições de qPCR.

Com o objetivo de minimizar a possível formação de estruturas secundárias, foi determinada a concentração ideal de cada iniciador para a reação. Para tal, foi feita uma curva com as seguintes concentrações de iniciador: 800, 400, 200, 100, 50 e 0 nmol.L⁻¹ seguindo o protocolo do item 5.10. Através desta curva foi possível verificar qual a menor concentração na qual o iniciador não é limitante para a reação, desta maneira não há excesso de iniciador na reação, o que dificulta a formação das estruturas secundárias.

TABELA 5 – INICIADORES UTILIZADOS NA qPCR.

INICIADOR	AzoR2.1		Azo2		16s rRNA	
SEQUÊNCIA	F CGCCACCATGCGATCAA R GCATGCCCACTACTGCAAGTC		F GCGCGGGAAGTCCTGAAT R CCCTTCACCATCCAGTCGAT		F TCGCTAGTAATCGCGGATCA R TGTGACGGGCGGTGTGTA	
TAMANHO DO AMPLIFICADO (pb)	90		90		73	
T _m (C°) ¹	68,8 67,2		68,0 66,6		65,9 68,2	
ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS ²	Sensibilidade 1	1	Sensibilidade 1	4	Sensibilidade 1	3
	Sensibilidade 2	1	Sensibilidade 2	2	Sensibilidade 2	1
	Sensibilidade 3	0	Sensibilidade 3	0	Sensibilidade 3	0

¹Valores de T_m calculados através da ferramenta *Multiple Primer Analyzer* (www.lifetechnologies.com).

²Análise da formação de estruturas secundárias pelos iniciadores *in silico* realizada com a ferramenta *Multiple Primer Analyzer* (www.lifetechnologies.com); a sensibilidade para detecção de formação de dímeros varia de 1 a 10, sendo 1 o valor de sensibilidade máxima e 3 o valor considerado ótimo. A formação dos dímeros é mostrada na figura 8.

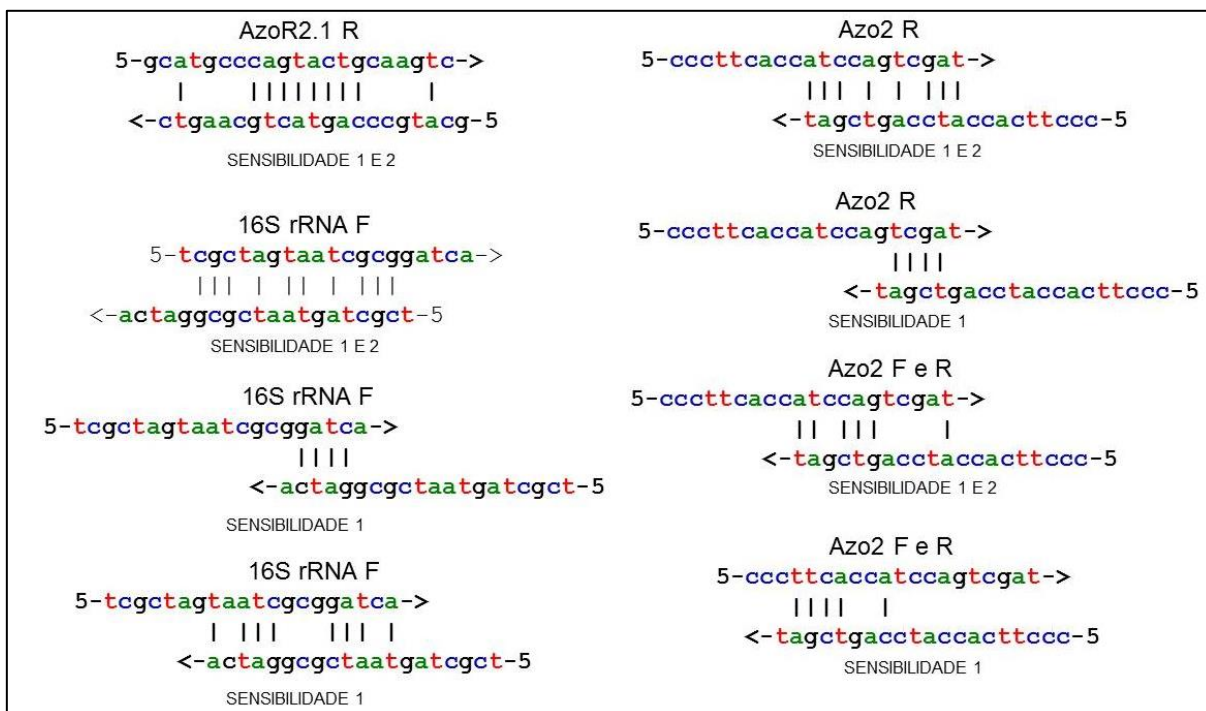


FIGURA 8 - ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PELOS INICIADORES *IN SILICO* REALIZADA COM A FERRAMENTA *Multiple Primer Analyzer* (www.lifetechnologies.com).

O par de iniciadores 16S rRNA foi utilizado com o objetivo de quantificar as bactérias totais presentes nas amostras. Inicialmente, a concentração ideal para este iniciador foi determinada através dos valores de Ct para reações contendo diferentes concentrações dos iniciadores (tabela 5). As concentrações de 800, 400 e 200 nmol.L⁻¹ obtiveram valores de Ct próximos. Para as concentrações de 100 e 50 nmol.L⁻¹ os valores de Ct foram significativamente mais altos. Por estes resultados a menor concentração na qual o iniciador não é limitante para a reação foi determinada como 200 nmol.L⁻¹. Mesmo nesta concentração ótima foram obtidos valores altos para o Ct na reação controle, sugerindo uma possível formação de estruturas secundárias (figura 8).

Também foram observados valores de Ct mais baixos para as reações contendo somente DNA da planta, em relação às reações contendo DNA da planta e da bactéria (tabela 5). Uma vez que a concentração total de DNA nas reações foi padronizada (item 6.1), o DNA de planta está mais concentrado nas reações contendo somente DNA da planta e menos concentrado nas reações contendo a mistura de DNA de planta e bactéria. Estes resultados sugerem que a afinidade dos iniciadores é maior para o DNA da planta do que pelo DNA da bactéria, possivelmente devido a presença do gene 18S rRNA mitocondrial e/ou 16S rRNA do

cloroplasto (MAGNANI, 2009). Através de uma análise de hibridização *in silico* do par de iniciadores 16S rRNA, realizada com a ferramenta Probe Match do RDP II (rdp.cme.msu.edu), foi verificado que estes iniciadores possuem identidade significativa com até 34,86% das sequências de cloroplasto disponível no banco de dados RDP II (tabela 20). Esta análise *in silico* não permite identificar possíveis anelamentos do par de iniciadores com sequências do gene 18S rRNA mitocondrial. Desta forma o iniciador 16S rRNA não permitiu a quantificação de bactérias totais das amostras. STETS (2013) utilizou este par de iniciadores para quantificação de bactérias totais em amostras de trigo, em experimentos conduzidos em casa de vegetação, sob condições estéreis e não-estéreis e obteve resultados significativos. Estes resultados não foram obtidos novamente no presente trabalho, provavelmente devido ao milho conter sequências dos genes 16S rRNA e 18S rRNA do cloroplasto e mitocôndria, respectivamente, com maior afinidade pelos iniciadores, visto que quando o experimento é realizado em trigo, a utilização destes iniciadores é eficiente.

TABELA 6 - VALORES DE Ct PARA A AVALIAÇÃO DO PAR DE INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA.

CONCENTRAÇÃO ¹ (nmol/L)	CONTROLE (H ₂ O) ²	AMOSTRA ³	PLANTA ⁴
800	27,76045	19,60442	17,47937
400	28,80858	19,79077	17,79934
200	28,15455	19,63912	17,20565
100	30,18555	20,56069	17,82209
50	30,81555	22,92587	20,42813
0	indeterminado	indeterminado	indeterminado

¹A CONCENTRAÇÃO INDICADA É PARA CADA UM DOS INICIADORES USADOS NA REAÇÃO;
²CONTROLE: ÁGUA MILLI-Q ESTÉRIL FOI ADICIONADA PARA COMPLETAR O VOLUME DA REAÇÃO, QUE NÃO CONTÉM DNA. ³AMOSTRA: DNA DO PRIMEIRO PONTO DA CURVA PADRÃO DE DNA. ⁴PLANTA: DNA SOMENTE DA PLANTA CULTIVADA EM TUBO EM CONDIÇÕES ESTÉREIS.

O par de iniciadores espécie-específico Azo-2 foi desenvolvido por STETS (2013) para quantificação de *Azospirillum brasilense* por qPCR. Este par de iniciadores foi utilizado no presente trabalho para quantificação da espécie nas raízes de plantas de milho cultivadas a campo. Entretanto, os testes para determinação da concentração ideal do par de iniciadores para sua utilização na qPCR, mostrou que esta concentração estava acima de 800 nmol.L⁻¹, a mais alta normalmente utilizada. Uma curva padrão com a concentração de iniciadores de 1,0 mmol.L⁻¹ foi então construída, porém não apresentou a qualidade mínima necessária, apresentando um R² de 0,9107. Através da utilização deste iniciador também não foi possível quantificar amostras que apresentavam quantidades significativas de *Azospirillum brasilense*, pois estes organismos foram quantificados nestas amostras utilizando o iniciador estirpe-específico. O uso do iniciador Azo-2 foi então descartado, visto que ele não foi eficiente para a quantificação estirpe específica. Os valores de Ct e a curva padrão para este iniciador são mostrados na tabela 6 e na figura 9.

TABELA 7 - VALORES DE Ct PARA A CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O INICIADOR AZO-2.

CURVA	Ct
10^5	21,75
10^4	26,36
10^3	30,94
10^2	32,48
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	33,22
planta	35,86

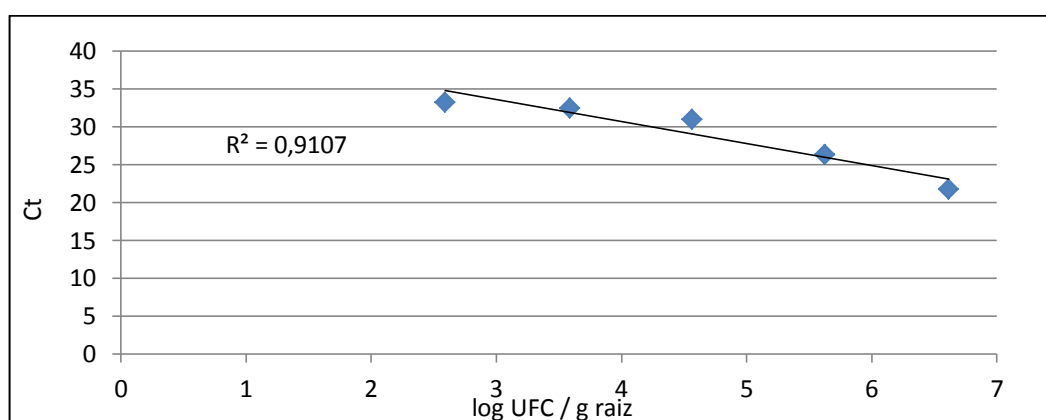


FIGURA 9 - CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O INICIADOR Azo-2.

O par de iniciadores AzoR2.1 foi utilizado para a quantificação do *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7. Primeiramente foi verificada que a concentração ideal do par de iniciadores AzoR2.1 era de 400 nmol.L^{-1} . Utilizando a concentração ideal dos iniciadores, a PCR em tempo real foi também testada para reações em volumes finais de 5, 10 e 20 μL . Para os volume finais de 5 e 10 μL , somente três pontos foram incluídos na faixa de linearidade das curvas padrão de concentração de DNA e Ct da reação (tabela 7). Para um volume final de 20 μL da reação da PCR, foi possível obter uma curva padrão para concentração de DNA e Ct da reação de mais alta qualidade, permitindo a inclusão de quatro pontos na faixa de linearidade. Esta última curva apresentou ainda uma variação significativamente menor nos valores de Ct para os experimentos independentes. Os valores de Ct e a curva padrão de DNA são mostrados na tabela 8 e na figura 10, respectivamente.

TABELA 8 – VALORES DE Ct PARA REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL EM REAÇÕES COM DIFERENTES VOLUMES UTILIZANDO O PAR DE INICIADORES AzoR2.1.

UFC/100µ	VOLUME FINAL DA REAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL		
	5 µL	10 µL	20 µL
10^5	25,75	23,47	22,801
10^4	29,76	27,24	27,61
10^3	32,10	29,78	29,48
10^2	indeterminado	indeterminado	35,43
$T_{2014}N_{50}I^{+5}$	indeterminado	37,42	33,17
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	30,35	29,93	28,98
PLANTA	indeterminado	36,87	36,57

TABELA 9 – VALORES DE Ct PARA A CURVA PADRÃO DE DNA UTILIZANDO O PAR DE INICIADORES AzoR2.1.

UFC/100µ	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3	PLACA 4	PLACA5	Ct MÉDIO	SD
10^5	24,19	23,14	24,36	24,53	24,17	24,08	0,49
10^4	27,59	27,49	27,60	27,73	27,50	27,58	0,09
10^3	30,69	29,63	30,50	30,63	30,73	30,44	0,41
10^2	34,11	34,21	34,18	35,58	34,43	34,50	0,55
PLANTA	38,15	36,09	38,46	38,48	37,77	37,79	0,89

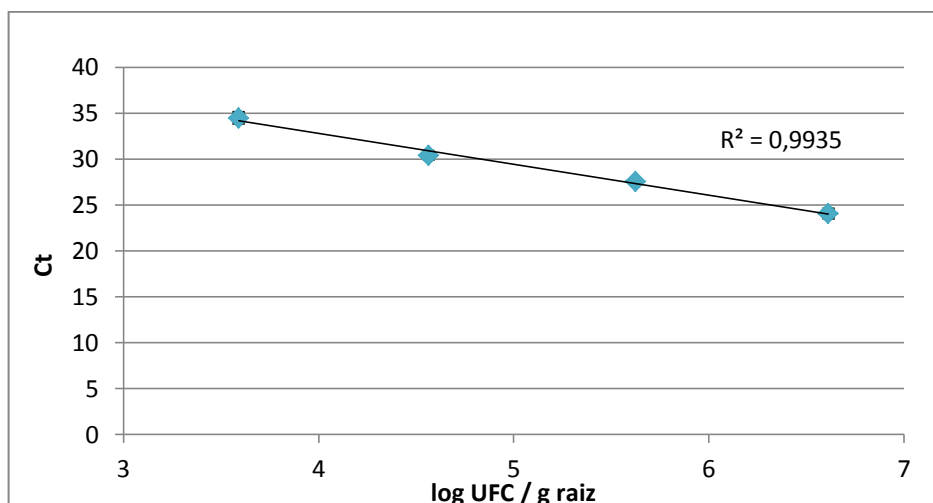


FIGURA 10 – CURVA PADRÃO DE DNA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO *Azospirillum brasilense* Ab-V5. AS REAÇÕES FORAM PREPARADAS PARA UM VOLUME FINAL DE 20 μ L.

6.3 Experimento de inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho a campo (2012)

Experimento a campo com plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubação nitrogenada e inoculação com as estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* foi conduzido na Estação Experimental “Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR, de outubro de 2012 a fevereiro de 2013. Amostras de plantas foram colhidas no estágio V8 e no final do ciclo produtivo para monitoramento da população das estirpes de *A. brasilense* inoculadas (estágio V8) e análise biométrica (estágio V8 e final do ciclo produtivo).

6.3.1 Avaliação Biométrica

A avaliação dos parâmetros biométricos e de produção foi realizada por JUNIOR (2013). Somente três parâmetros biométricos, de um total de 18 medidos, apresentaram diferenças significativas para os tratamentos com inoculação com as estirpes de *Azospirillum brasilense*: diâmetro do colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) (tabela 9). Frequentemente, os efeitos de promoção de crescimento observados para estirpes de *A. brasilense* são demonstrados na raiz. Entretanto, não foi observada diferença significativa em nenhum dos oito

parâmetros biométricos medidos para raiz. Em relação aos componentes da produção, do total de 5 parâmetros medidos, 4 mostraram diferenças significativas para os tratamentos inoculados com as estirpes de *A. brasilense*: comprimento da espiga (CE), número de fileiras por espiga (NFE), número de grãos por fileira (NGF) e massa de mil grãos (MMG) (tabela 10).

A partir dos resultados observados, os tratamentos $T_{2012}N_{50}I^-$, $T_{2012}N_{50}I^{+7}$, $T_{2012}N_{50}I^{+56}$ e $T_{2012}N_{50}I^{+567}$ foram selecionados para análise quantitativa das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) em relação ao controle $T_{2012}N_0I^-$.

TABELA 10- DADOS BIOMÉTRICOS PARA EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE MILHO COM AS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7 DE AZOSPIRILLUM BRALISENE A CAMPO, CONDUZIDO EM 2012.

TRATAMENTO	DC (cm)	MSPA (g/planta)	AF (dm ²)
$T_{2012}N_0I^-$	24,19c	33,00c	45,50
$T_{2012}N_{50}I^-$	24,68c	40,00c	57,00
$T_{2012}N_{100}I^-$	26,83b	55,00a	68,75
$T_{2012}N_{50}I^{+5}$	26,13b	46,25b	66,00
$T_{2012}N_{50}I^{+6}$	26,50b	49,00a	64,75
$T_{2012}N_{50}I^{+7}$	29,10a	57,25a	71,75
$T_{2012}N_{50}I^{+56}$	29,21a	59,00a	74,50
$T_{2012}N_{50}I^{+57}$	27,66a	51,25a	64,50
$T_{2012}N_{50}I^{+67}$	27,07a	48,50a	61,00
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	26,72a	46,50a	59,25

DIÂMETRO BASAL DO COLOMO (DC), MASSA SECA DA PARTE AÉREA (MSPA) E ÁREA FOLIAR (AF). MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA MINÚSCULA NA COLUNA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT A 5% DE PROBABILIDADE.

FONTE: JUNIOR, 2013.

TABELA 11 – DADOS REFERENTES À PRODUÇÃO PARA EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE MILHO COM AS ESTIRPES Ab-V5, Ab-V6 E Ab-V7 DE *AZOSPIRILLUM BRALISENSE* A CAMPO, CONDUZIDO EM 2012.

TRATAMENTO	CE (cm)	NFE	NGF	MMG (g)
T ₂₀₁₂ N ₀ I ⁻	20,25c	21,00c	31,25b	290,75d
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁻	19,75c	21,25c	31,25b	287,75d
T ₂₀₁₂ N ₁₀₀ I ⁻	21,75b	22,75b	35,75a	295,25c
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵	21,00b	22,50b	35,00a	288,62d
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁶	20,00b	22,25b	33,00b	300,25c
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁷	22,75b	22,00b	37,50a	324,00a
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵⁶	21,00c	21,50c	34,50a	308,37b
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵⁷	20,25b	22,25b	34,50a	311,12b
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁶⁷	23,00b	22,25b	35,75a	311,50b
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵⁶⁷	23,25a	23,75a	38,25a	329,87a

COMPRIMENTO DA ESPIGA (CE), NÚMERO DE FILEIRAS POR ESPIGA (NFE), NÚMERO DE GRÃOS POR FILEIRA (NGF) E MASSA DE MIL GRÃOS (MMG). MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA MINÚSCULA NA COLUNA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT A 5% DE PROBABILIDADE.

FONTE: JUNIOR, 2013.

6.3.2 Quantificação de *Azospirillum brasilense* por qPCR

Foi possível quantificar todas as amostras do experimento 2012, elas apresentaram valores de Ct dentro da curva padrão, gerada a partir da mistura de DNA de planta e da bactéria. A quantificação destas amostras pode ser visualizada na tabela 11 e na FIGURA 11 11.

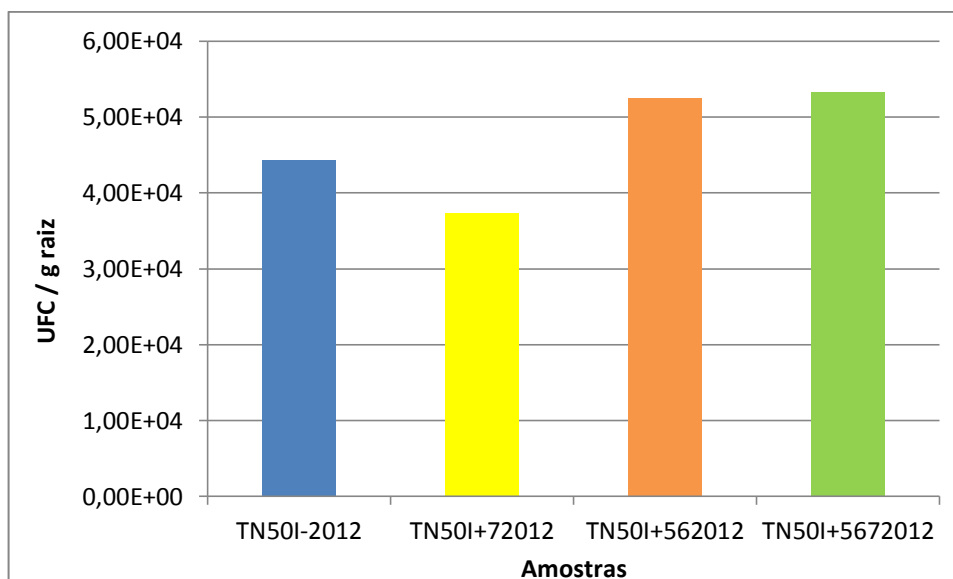


FIGURA 11 – QUANTIFICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* Ab-V5 PELO INICIADOR AzoR2.1(EXPERIMENTO 2012).

TABELA 12 – QUANTIFICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* Ab-V5 PELO INICIADOR AzoR2.1(EXPERIMENTO 2012).

TRATAMENTO	Ct MÉDIO	QUANTIFICAÇÃO (UFC g raiz-1)	QUANTIFICAÇÃO MÉDIA
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁻	30,85	4,05E+04	4,43E+04
	30,60	4,82E+04	
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁷	30,69	4,53E+04	3,74E+04
	31,31	2,95E+04	
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵⁶	29,89	7,85E+04	5,25E+04
	31,47	2,64E+04	
T ₂₀₁₂ N ₅₀ I ⁺⁵⁶⁷	29,91	7,73E+04	5,33E+04
	31,25	3,07E+04	

A quantificação das diferentes amostras revelou que todas apresentaram quantidades das estirpes inoculadas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 na mesma ordem de grandeza (10^4 UFC.g raiz⁻¹). Os tratamentos com associação entre diferentes estirpes apresentaram uma quantidade ligeiramente maior das estirpes inoculadas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Entretanto, no tratamento controle

(T₂₀₁₂N₅₀I⁻) também foi observada a presença das estirpes inoculadas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

Os tratamentos T₂₀₁₂N₅₀I⁺⁷ e T₂₀₁₂N₅₀I⁺⁵⁶ apresentaram os resultados mais significativos quanto aos parâmetros biométricos avaliados. As médias dos valores biométricos destes tratamentos são próximas, porém no que se refere à quantificação da bactéria inoculada, a diferença representa 1,51x10⁴ UFC.g raiz⁻¹, sendo que o tratamento T₂₀₁₂N₅₀I⁺⁷ apresentou o menor número populacional de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (3,74x10⁴ UFC.g raiz⁻¹) dentre os tratamentos avaliados, incluindo o tratamento controle (T₂₀₁₂N₅₀I⁻). O tratamento T₂₀₁₂N₅₀I⁺⁵⁶, foi aquele que apresentou os melhores valores quanto aos parâmetros de produção avaliados (tabela 10), correspondendo também ao maior nível populacional para a bactéria inoculada determinado (5,33x10⁴). Nível semelhante ao encontrado por Couillerot e colaboradores em 2010. Eles verificaram a presença de *Azospirillum lipoferum* CRT1 em milho em casa de vegetação a um nível de 10⁴ a 10⁶ UFC.graiz⁻¹ em plantas com 10 dias de crescimento, mas não foi demonstrado o efeito da promoção de crescimento nestes casos.

Azospirillum brasilense também foi quantificado por Couilleirot em casa de vegetação (2009). No monitoramento das estirpes UAP-154 e CFN-535 de *Azospirillum brasilense*, a 10 dias de crescimento, foram observadas uma densidade populacional da bactéria inoculada de 3x10⁶ e 1x10⁶ UFC por sistema radicular e 4,9x10⁵ e 1,9x10⁵ UFC por grama de raiz seca, respectivamente. Embora estes autores tenham encontrado níveis mais altos para as bactérias inoculadas, em comparação aos níveis observados neste trabalho, a quantificação foi dada em relação ao sistema radicular. As condições experimentais também podem ter influenciado a população de bactérias, considerando que, no campo, as condições são mais adversas e variáveis. Por outro lado, é surpreendente que a população das bactérias inoculadas tenha se mostrado estável no experimento a campo até atingirem o estágio V8. A identificação das estirpes inoculadas nas plantas controle, onde não houve inoculação das sementes sugere a presença da bactéria no solo, anteriormente a implantação do experimento, ou a possível contaminação entre as parcelas experimentais. A dificuldade em demonstrar os efeitos na promoção de crescimento das plantas nos tratamentos com inoculação, possivelmente ocorreram

devido a presenças das estirpes inoculadas no tratamento controle, nos mesmos níveis encontrados para os demais tratamentos (tabela 11).

STETS (2013) desenvolveu iniciadores estirpe-específicos para *Azospirillum brasilense* FP2 e utilizou no monitoramento desta estirpe inoculada em trigo, plantada em casa de vegetação aos 13 DAE. A quantificação indicou a presença da bactéria inoculada na ordem de 10^7 UFC.g raiz⁻¹, em condições experimentais estéreis e não estéreis e quando co-inoculada com estirpes de *A. brasilense* NH, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Gluconacetobacter diazotrophicus* DSM 5601 e *A. lipoferum* DSM 1691. Estes mesmos iniciadores foram utilizados neste trabalho para monitorar *A. brasilense* Ab-V5 em milho cultivado a campo, indicando a presença da bactéria inoculada na ordem de 10^4 UFC.g raiz⁻¹. Novamente, os níveis mais baixos podem ter ocorrido devido a maior adversidade das condições a campo.

Herbaspirillum seropedicae SmR1, uma bactéria também classificada como promotora do crescimento vegetal, foi quantificada em raízes de milho por Pereira e colaboradores (2014). Neste trabalho, os iniciadores foram desenhados especificamente para duas regiões encontradas com cópia única no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* e a especificidade foi confirmada por análises de alinhamento *in silico*. Entretanto, não foi possível demonstrar que os iniciadores são estirpe-específicos. Com estes iniciadores, *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 foi quantificado em 10^7 - 10^9 UFC.raiz⁻¹ em plantas crescidas *in vitro* e para bactérias crescidas em condições de casa de vegetação este nível foi de aproximadamente 10^6 UFC.raiz⁻¹, mas a promoção de crescimento não foi demonstrada.

6.4 Experimento de inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho a campo (2014)

Experimento a campo com plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubação nitrogenada e inoculação com a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* foi conduzido na Estação Experimental “Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa”, pertencente ao Núcleo de estações experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR, em março de 2014. Amostras de plantas foram colhidas nos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 14º e 28º dias após a emergência (DAE) para monitoramento da população da estirpe de *A. brasilense*

inoculada. Parâmetros biométricos foram medidos para as coletas feitas nos 7º, 14º e 28º DAE.

6.4.1 Avaliação Biométrica

Para o 7º DAE não foram observados efeitos significativos quando o tratamento envolvia a inoculação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Estes efeitos somente foram observados quando a fonte de variação era a dose de nitrogênio nas variáveis comprimento de raízes nodais e índice SPAD (RAMPIM, 2014).

No 14º DAE também não foram observadas diferenças biométricas significativas para os tratamentos com inoculação. Quanto às doses de nitrogênio, foram observados incrementos no sistema radicular somente para a dose máxima de fertilização nitrogenada sem inoculação (SOUZA, 2014).

A associação entre o *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e as diferentes doses de nitrogênio não apresentou nenhuma interação significativa para nenhuma variável analisada no 28º DAE. Porém, ao observar as diferentes doses de nitrogênio isoladamente, nota-se que as seguintes variáveis são influenciadas: comprimento da parte aérea, número de folhas e índice SPAD (KESTRING, 2014).

6.4.2 Quantificação de *Azospirillum brasilense*

Plantas de milho submetidas a tratamentos de inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 e diferentes regimes de adubação nitrogenada, foram cultivadas a campo. A maior parte das amostras apresentou um valor de Ct para a reação da PCR em tempo real superior ao valor máximo obtido para a curva padrão de concentração da mistura de DNA da planta e bactéria (34,50) como é mostrado na FIGURA 12. Os valores de Ct deste experimento são mostrados na TABELA 20. As amostras foram obtidas em diferentes intervalos de tempo, do 1º ao 28º DAE, não tendo sido detectada a presença da bactéria em nenhum dos pontos analisados, sugerindo que, para este experimento, não houve colonização efetiva da bactéria inoculada. Poucas amostras apresentaram níveis de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 suficientes para o limite de detecção da qPCR. As amostras foram coletadas em triplicata no

campo, mas para as amostras onde foi possível detectar a bactéria, as repetições experimentais não confirmaram os níveis de detecção. Os níveis da bactéria inoculada nestas amostras foram baixos, na sua maioria na ordem de 10^3 UFC.g raiz⁻¹. Para duas repetições da amostra T₂₀₁₄N₀I⁻, no 6º DAE foi possível quantificar a bactéria inoculada, mas em baixos níveis populacionais (tabela 12). Este resultado confirma o resultado obtido para o experimento 2012, onde também foi detectada a presença da bactéria inoculada no tratamento sem inoculação, sugerindo a presença da bactéria no solo.

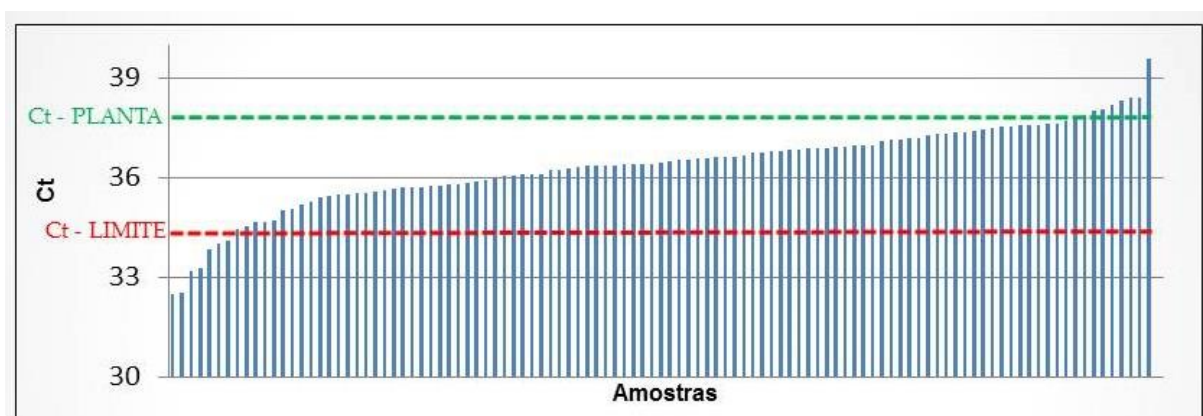


FIGURA 12 - VALORES DE Ct DAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO 2014. A LINHA VERMELHA INDICA O VALOR DE Ct DO LIMITE DE DETECÇÃO DA CURVA PADRÃO DE DNA (34,50) E A LINHA VERDE O VALOR DE Ct DA PLANTA SEM INOCULAÇÃO CULTIVADA EM CONDIÇÕES ESTÉREIS (37,77).

Neste experimento, diferenças biométricas caracteristicamente proporcionadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal não foram observadas. Vários fatores podem estar relacionados a esta observação: i) a bactéria inoculada *Azospirillum brasilense* Ab-V5 não foi detectada na maior parte das raízes das plantas amostradas; ii) baixa eficiência de colonização, nas amostras onde a bactéria inoculada foi detectada; iii) presença da bactéria no solo, indicada pela detecção da bactéria inoculada no tratamento controle.

TABELA 13 - QUANTIFICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* Ab-V5 INOCULADO EM MILHO A CAMPO PELO PAR DE INICIADORES AzoR2.1 (EXPERIMENTO 2014).

TRATAMENTO	DAE	Ct MÉDIO	QUANTIFICAÇÃO (UFC.graiz ⁻¹)
T ₂₀₁₄ N ₀ I ⁻	6	33,83	4,47E+03
T ₂₀₁₄ N ₀ I ⁻	6	34,03	3,89E+03
T ₂₀₁₄ N ₀ I ⁺⁵	2	33,25	5,85E+03
T ₂₀₁₄ N ₀ I ⁺⁵	6	33,17	6,19E+03
T ₂₀₁₄ N ₅₀ I ⁻	6	32,53	1,10E+04
T ₂₀₁₄ N ₅₀ I ⁺⁵	6	32,51	1,30E+04

7 CONCLUSÕES

Os iniciadores 16S rRNA e Azo-2 não permitiram a quantificação de bactérias totais e da espécie *Azospirillum brasilense*, porém os resultados mostram que a técnica de PCR em tempo real quantitativa é uma metodologia que pode ser aplicada para a quantificação e monitoramento da população de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal inoculadas a campo. A utilização do iniciador AzoR2.1 permitiu a quantificação das estirpes Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 de *Azospirillum brasilense* a campo através desta metodologia. No experimento 2012, foi possível quantificar o inoculante nas raízes das plantas, que mostraram diferenças biométricas e de produção, entre $3,74 \times 10^4$ e $5,33 \times 10^4$ UFC.g raiz⁻¹. As estirpes inoculadas também foram quantificadas no tratamento controle ($4,43 \times 10^4$ UFC.g raiz⁻¹).

A estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* não foi detectada na maioria das amostras de raízes do experimento 2014, porém alguns resultados obtidos indicam a presença do inoculante também no tratamento controle, confirmando o resultado verificado para o experimento 2012. No experimento 2014 não foram verificadas diferenças significativas caracteristicamente proporcionadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. V.2 – SAFRA 2014/2015. N.5 – Quinto Levantamento, Brasília, p. 2-116, fev. 2015.

COUILLEROT, O., BOUFFAUD, M.L., BAUDOUIN, E., MULLER, D., CABALLERO-MELLADO, J. AND MOENNE-LOCCOZ, Y. Development of a Real-time PCR Method to Quantify the PGPR Strain *Azospirillum Lipoferum* CRT1 on Maize Seedlings. *Soil Biology & Biochemistry* v. 42, p. 2298-2305, 2010.

COUILLEROT, O., POIRIER, M.-A, PRINGENT-COMBARET, C., MAVINGUI, P., CABALLERO-MELLADO, J., MOËNNE- LOCCOZ, Y. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. *Journal of Applied Microbiology* v. 109, p. 528-538, 2010.

CREUS, C.M., GRAZIANO, M., CASANOVAS, E.M., PEREYRA, M.A., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., BARASSI, C.A., LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* v. 221, p. 297–303, 2005.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., PTACEK, D., OKON, Y., VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils* v. 36, p. 284–297, 2002.

DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 22, n. 2, p. 107 –149, 2003.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGENSEN, F.J. (Ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York: John Wiley & Sons, p. 535-555, 1980.

EGENER, T., HUREK, T., AND REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of nif genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 813–819, 1999.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/ecofisiologia.htm, acesso em 26 fev. 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fisiologia e Produção de Milho. Circular Técnica, 2006.

FADERL, S., HOCHHAUS, A., HUGHES, M. D. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* v. 18, p. 657-70, 2004.

HARTMANN, A. e ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. *Azospirillum/Plant Associations* (Okon Y., Ed.), p 15-39, 1994.

JACOUD, C., JOB, D., WADOUX, P., BALLY, R. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology* v. 45, p 339 – 342, 1999.

JUNIOR, A. S. P. Redução da adubação nitrogenada na cultura do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense*. 2013. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

KESTRING, D., RAMPIM, L., BATTISTUS, A., KLEIN, J., LEMKE, V. T., GUIMARÃES, V. F. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Revista SECIAGRA*, v.2, 2014. SOUZA, A. K. P., ,

CLÁUDIO, L.,

LAMM, R.B., NEYRA, C.A. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. Canadian Journal of Microbiology v. 27, p 1320 – 1325, 1981.

MAGNANI, G.S. Análise da biodiversidade de bactérias endofíticas de colmo de cana-de-açúcar cultivada no noroeste do Paraná. 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná.

OKON, Y., KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant and Soil v 90, p 3-16, 1986.

OKON, Y., LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry v. 26, p1591 – 1601, 1994.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, K.R. S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. European Journal of Soil Biology v. 45, p. 36-43, 2009.

PEREIRA, T.P., AMARAL, F.P., DALL'ASTA, P., BROD, F.C.A., ARISI, A.M. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. Molecular Biotechnology Journal v. 56, p 660-670, 2014.

PRIGENT-COMBARET, C., BLAHA, D., POTHIER, J.F., VIAL, L., POIRIER, M., WISNIEWSKI-DYÉ, F, MOËNNE-LOCCOZ, Y. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. FEMS Microbiology Ecology v65, p 202-219, 2008.

RAMPIM, L., KESTRING, D., BULEGON, L. TAVARES, L. F., COMAR, C. G., GUIMARÃES, V. F. *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio no desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea de plantas de milho cultivado em solo argiloso. Revista SECIAGRA, v.2, 2014.

ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão. Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. Disponível em: < <http://dc451.4shared.com/doc/Oy2uUTUh/preview.html> >. Acesso em: 26 set. 2013.

SØRENSEN, J., NICOLAISEN, M. H., RON, E., SIMONET, P. Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. *Plant and Soil* v. 321, p. 483-512, 2009.

SOUZA, A. K. P., RAMPIM, L., KESTRING, D., CLÁUDIO, L., GUIMARÃES, V. F. Associação entre adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. Revista SECIAGRA, v.2, 2014.

STEENHOUDT, O., VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* v. 24, p. 487-506, 2000.

STETS, M.I. Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*). 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná.

TAL, S., OKON. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutirate and its function in *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*. v.31, 608-613, 1985.

WEISMANN, M. Fases do Desenvolvimento da Cultura do Milho. Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Cultura do Milho. P.31-38, 2008.

APÊNDICES

TABELA 14 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DNA E DA PLANTA CONTROLE.

PONTO DA CURVA	PESO (G)	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME CURVA
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
10^5	0,042	2,10	2,43	2,36	2,08	2,88	2,52	5,50	5,60	5,80	5,63	0,14	68,34	81,66
10^4	0,041	2,26	2,54	2,32	1,76	3,18	2,78	7,30	5,10	5,50	5,30	1,17	72,64	77,36
10^3	0,048	2,07	2,24	2,21	5,63	4,21	3,73	6,00	6,20	6,10	6,10	0,10	63,11	86,89
10^2	0,045	2,05	2,32	2,42	1,71	2,67	2,81	5,50	5,00	4,70	5,07	0,40	75,99	74,01
planta	0,045	2,49	1,94	2,31	1,89	1,62	1,06	4,70	5,30	4,80	4,93		26,01	23,99

TABELA 15 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO EXPERIMENTO 2012.

AMOSTRA	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME ÁGUA
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
$T_{2012}N_{50}I^-$	2,3	2,15	2,18	0,03	0,03	0,03	19,9	23,4	24,6	24	0,424264	5,347222	44,65278
$T_{2012}N_{50}I^-$	1,97	1,99	1,86	0,21	0,22	0,29	45	47,3	68,3	46,15	1,626346	2,780787	47,21921
$T_{2012}N_{50}I^{+7}$	1,92	1,91	1,89	0,25	0,25	0,26	42,9	42,7	44	42,8	0,141421	2,998442	47,00156
$T_{2012}N_{50}I^{+7}$	1,97	1,9	1,96	0,2	0,22	0,19	47,5	54,9	45,1	46,3	1,697056	2,771778	47,22822
$T_{2012}N_{50}I^{+56}$	1,71	1,82	1,83	0,11	0,08	0,08	47,1	32,6	33,3	32,95	0,35	3,89479	46,10521
$T_{2012}N_{50}I^{+56}$	1,92	1,83	1,94	0,15	0,18	0,14	46,2	54,4	42	44,1	1,484924	2,910053	47,08995
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	1,98	1,91	1,92	0,25	0,26	0,28	33,6	34,5	38,5	34,05	0,636396	3,768967	46,23103
$T_{2012}N_{50}I^{+567}$	1,9	1,93	1,85	0,33	0,3	0,32	51,8	45,7	52,9	52,35	0,777817	2,451449	47,54855

TABELA 16 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T₂₀₁₄N₀I⁻.

AMOSTRA		PESO (g)	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME ÁGUA
DAE	PARCELA		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
1	4	0,050	1,87	1,95	1,87	2,30	2,45	2,21	15,60	14,70	15,40	15,23	0,47	8,42	41,58
	10	0,043	1,89	1,83	1,89	2,06	2,20	2,16	33,70	35,50	32,40	33,05	0,92	3,88	46,12
	14	0,044	1,90	1,88	1,90	1,37	1,65	1,70	33,00	34,40	35,90	34,43	1,45	3,73	46,27
2	4	0,051	1,91	1,91	1,91	1,78	1,88	1,88	41,80	46,10	39,80	40,80	1,41	3,15	46,85
	10	0,044	1,76	1,86	1,76	-16,12	-9,36	17,28	13,90	14,20	13,80	13,97	0,21	9,19	40,81
	14	0,050	1,91	1,91	1,91	1,69	1,87	2,15	43,30	37,30	36,50	36,90	0,57	3,48	46,52
3	4	0,045	1,94	2,11	1,92	8,13	-32,67	-10,51	9,80	9,80	9,50	9,80	0,00	13,10	36,90
	10	0,045	2,22	2,35	2,22	-1,66	-1,26	-1,65	4,60	4,00	4,30	4,30	0,30	29,84	20,16
	14	0,046	2,08	1,90	1,90	-35,43	-42,76	-31,07	9,60	9,90	9,60	9,60	0,00	13,37	36,63
4	4	0,044	1,98	2,00	1,91	-2,34	-0,79	4,37	7,10	6,00	8,50	7,20	1,25	17,82	32,18
	10	0,044	1,85	1,96	1,87	-7,98	-7,17	-19,03	11,30	11,50	12,40	11,73	0,59	10,94	39,06
	14	0,050	1,86	1,95	2,01	-2,17	5,09	-5,16	6,80	9,30	7,70	7,25	0,64	17,70	32,30
5	4	0,048	1,73	1,94	1,79	-1,02	-0,98	-1,07	6,40	6,20	6,80	6,47	0,31	19,85	30,15
	10	0,049	2,02	1,96	2,04	-23,28	-306,11	-6,66	10,60	8,70	8,70	8,70	0,00	14,75	35,25
	14	0,047	1,88	1,94	1,85	-11,65	-12,37	-18,16	13,90	13,90	14,40	13,90	0,00	9,23	40,77
6	4	0,045	2,26	2,40	2,52	-2,37	-1,08	-1,82	3,60	3,30	4,00	3,63	0,35	35,32	14,68
	10	0,047	2,17	2,17	2,09	1,35	-3,32	-8,88	5,20	6,00	6,50	5,90	0,66	21,75	28,25
	14	0,051	2,17	2,05	1,92	-17,73	-7,45	-8,62	8,30	8,10	8,50	8,30	0,20	15,46	34,54
7	4	0,047	1,88	1,86	2,05	-1,64	-1,55	-1,54	6,40	6,80	6,80	6,80	0,00	18,87	31,13
	10	0,050	1,93	2,04	1,99	-3,25	-1,35	-1,69	10,90	8,60	9,20	8,90	0,42	14,42	35,58
	14	0,044	1,96	1,93	1,97	3,22	3,34	4,00	12,20	13,80	13,20	13,07	0,81	9,82	40,18
14	4	0,044	1,74	1,82	1,80	-2,66	-1,98	-1,54	4,70	3,90	3,70	4,10	0,53	31,30	18,70
	10	0,041	1,91	1,78	1,87	113,24	5,93	-3,48	9,90	10,80	8,70	10,35	0,64	12,40	37,60
	14	0,049	1,91	1,93	1,88	2,90	2,87	2,74	16,10	15,80	16,90	16,27	0,57	7,89	42,11
28	4	0,044	1,83	1,95	1,87	10,03	128,17	103,16	10,90	10,00	10,20	10,37	0,47	12,38	37,62
	10	0,048	1,87	1,90	1,89	20,06	20,96	266,80	8,70	10,00	9,60	9,43	0,67	13,60	36,40

	14	0,043	1,79	1,94	1,78	-2,34	-3,56	-4,77	6,60	7,40	8,30	7,43	0,85	17,26	32,74
--	----	-------	------	------	------	-------	-------	-------	------	------	------	------	------	-------	-------

TABELA 17 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T₂₀₁₄N₀I⁺⁵.

AMOSTRA		PESO (g)	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME ÁGUA
DAE	PARCELA		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
1	5	0,041	1,99	1,92	1,90	-16,07	-12,66	11,67	13,80	14,00	19,60	13,90	0,14	9,23	40,77
	9	0,046	1,92	1,96	1,82	4,09	3,58	2,43	13,60	16,40	13,80	13,70	0,14	9,37	40,63
	15	0,048	2,00	1,92	2,05	4,52	5,21	21,53	14,50	15,30	13,80	14,53	0,75	8,83	41,17
2	5	0,049	1,99	2,05	2,07	106,89	12,01	20,34	10,70	12,70	11,00	10,85	0,21	11,83	38,17
	9	0,044	2,00	2,09	1,98	4,66	4,58	4,61	12,60	12,80	12,80	12,80	0,00	10,03	39,97
	15	0,044	1,98	1,97	2,03	15,53	20,77	5,46	7,60	7,70	10,60	7,65	0,07	16,78	33,22
3	5	0,047	1,83	1,80	1,91	6,22	5,18	4,03	9,30	9,60	9,30	9,30	0,00	13,80	36,20
	9	0,043	2,00	1,83	1,96	4,18	3,53	3,57	7,80	8,20	7,90	7,97	0,21	16,11	33,89
	15	0,048	1,86	1,91	1,98	2,39	2,80	2,65	24,30	22,40	22,00	22,20	0,28	5,78	44,22
4	5	0,041	1,98	1,96	2,07	2,66	3,30	3,38	10,80	9,80	11,00	10,53	0,64	12,18	37,82
	9	0,045	1,75	1,93	2,03	2,36	17,00	33,40	8,20	6,50	6,30	6,40	0,14	20,05	29,95
	15	0,046	2,27	2,07	2,02	3,61	4,97	12,34	5,30	5,50	6,20	5,67	0,47	22,65	27,35
5	5	0,044	1,78	1,96	1,97	2,89	5,99	7,81	11,30	9,10	9,00	9,05	0,07	14,18	35,82
	9	0,047	2,11	2,63	1,74	-29,41	-16,05	2,22	3,90	3,70	7,10	3,80	0,14	33,77	16,23
	15	0,044	1,90	2,01	2,00	9,28	6,52	4,87	6,90	6,90	6,70	6,90	0,00	18,60	31,40
6	5	0,043	1,91	1,91	1,71	3,59	111,47	2,61	5,90	5,60	7,00	5,75	0,21	22,32	27,68
	9	0,046	1,93	1,92	1,89	3,06	3,03	3,05	10,00	10,10	10,30	10,13	0,15	12,66	37,34
	15	0,043	1,95	1,90	2,09	16,11	12,28	-60,01	6,80	6,90	6,90	6,90	0,00	18,60	31,40
7	5	0,045	2,14	1,89	1,93	2,67	3,26	2,48	9,00	9,10	9,60	9,23	0,32	13,90	36,10
	9	0,042	2,12	2,06	2,19	2,44	3,12	13,78	3,90	4,10	4,00	4,00	0,10	32,08	17,92
	15	0,044	2,01	1,92	1,87	23,22	18,75	4,14	5,90	6,10	5,70	5,90	0,20	21,75	28,25
14	5	0,047	2,26	2,24	2,00	2,14	2,21	2,11	6,40	6,60	7,50	6,83	0,59	18,78	31,22
	9	0,049	1,94	1,97	1,96	2,03	2,78	2,24	9,60	9,60	9,60	9,60	0,00	13,37	36,63
	15	0,041	1,97	1,98	1,99	2,16	2,20	2,26	16,80	16,80	17,10	16,80	0,00	7,64	42,36

28	5	0,043	2,13	2,14	2,00	2,98	2,95	4,25	4,60	4,50	4,20	4,43	0,21	28,95	21,05
	9	0,043	1,92	2,11	1,89	3,23	8,74	3,93	5,20	5,10	6,00	5,43	0,49	23,62	26,38
	15	0,045	2,20	1,98	2,32	3,08	4,11	2,73	3,60	3,70	3,50	3,60	0,10	35,65	14,35

TABELA 18 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T₂₀₁₄N₅₀l⁻.

AMOSTRA		PESO (g)	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME ÁGUA
DAE	PARCELA		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
1	6	0,048	1,95	1,95	1,94	2,19	2,17	2,18	39,20	38,60	40,40	38,90	0,42	3,30	46,70
	8	0,041	1,68	1,88	1,94	1,07	1,64	1,92	18,90	12,40	11,10	11,75	0,92	10,92	39,08
	16	0,041	1,94	1,93	2,13	2,09	2,16	2,86	9,20	9,60	8,80	9,20	0,40	13,95	36,05
2	6	0,045	1,97	2,13	2,02	2,44	2,94	2,67	19,40	16,80	16,90	16,85	0,07	7,62	42,38
	8	0,047	1,99	2,00	1,96	2,13	2,02	1,84	35,00	39,80	48,50	37,40	3,39	3,43	46,57
	16	0,042	2,03	1,97	2,04	2,22	1,67	2,42	28,50	42,20	29,40	28,95	0,64	4,43	45,57
3	6	0,041	2,13	2,11	2,40	2,60	2,86	5,38	8,00	6,40	6,10	6,25	0,21	20,53	29,47
	8	0,048	2,09	2,13	2,09	2,61	2,66	2,66	16,40	15,50	17,30	16,40	0,90	7,83	42,17
	16	0,048	2,02	2,10	2,06	3,36	2,98	2,78	13,30	13,20	13,90	13,47	0,38	9,53	40,47
4	6	0,040	2,18	1,87	2,07	4,53	1,65	2,21	8,20	9,20	12,10	8,70	0,71	14,75	35,25
	8	0,042	2,04	2,03	1,91	3,16	3,01	2,45	17,70	18,20	36,10	17,95	0,35	7,15	42,85
	16	0,042	2,35	2,18	2,70	6,22	4,26	4,07	4,00	4,20	4,40	4,20	0,20	30,56	19,44
5	6	0,045	2,15	2,05	2,01	3,53	2,74	2,86	9,20	9,50	9,30	9,33	0,15	13,75	36,25
	8	0,046	2,19	2,33	2,09	7,68	6,10	5,73	5,20	4,80	5,30	5,10	0,26	25,16	24,84
	16	0,042	2,23	2,48	2,07	12,22	-11,04	-114,59	5,40	4,90	5,40	5,40	0,00	23,77	26,23
6	6	0,048	1,87	1,88	1,89	-5,14	-4,50	-6,42	4,80	5,50	5,10	5,13	0,35	25,00	25,00
	8	0,043	2,20	1,69	2,00	3,17	1,22	29,50	6,20	7,20	5,80	6,40	0,72	20,05	29,95
	16	0,042	1,72	1,64	1,73	2,46	2,59	2,51	7,00	7,60	7,40	7,33	0,31	17,50	32,50
7	6	0,045	1,87	2,00	1,89	3,87	5,44	4,93	6,00	6,00	6,50	6,00	0,00	21,39	28,61
	8	0,046	1,75	1,91	2,00	8,47	6,95	9,08	8,00	8,30	8,00	8,00	0,00	16,04	33,96
	16	0,046	1,42	1,87	1,73	1,70	-3,30	-3,41	4,50	3,30	3,40	3,35	0,07	38,31	11,69
14	6	0,044	1,93	2,63	1,92	5,86	-1,32	2,74	7,80	5,30	7,70	7,75	0,07	16,56	33,44

	8	0,049	2,02	1,90	2,05	2,45	3,01	3,02	8,60	9,10	11,40	8,85	0,35	14,50	35,50
	16	0,042	1,97	1,97	2,12	13,61	8,85	4,44	4,70	5,30	5,40	5,13	0,38	25,00	25,00
28	6	0,042	1,92	2,13	1,22	-2,14	-8,93	0,29	2,80	2,90	3,80	3,17	0,55	40,53	9,47
	8	0,043	2,17	2,12	1,93	6,67	23,64	38,30	4,20	4,30	5,10	4,53	0,49	28,31	21,69
	16	0,044	1,95	1,77	2,20	1,98	-2,88	-5,24	4,90	3,10	3,40	3,25	0,21	39,49	10,51

TABELA 19 - RESULTADOS DAS EXTRAÇÕES DE DNA DAS RAÍZES DE PLANTAS DO TRATAMENTO T₂₀₁₄N₅₀⁺⁵.

AMOSTRA		PESO (g)	260/280			260/230			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO MÉDIA	SD	VOLUME AMOSTRA	VOLUME ÁGUA
DAE	PARCELA		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3				
1	1	0,045	1,85	1,91	1,98	-1,72	4,61	-1,30	15,70	24,80	15,70	15,70	0,00	8,17	41,83
	7	0,045	1,89	1,91	1,90	2,18	2,29	2,31	52,10	52,90	52,30	52,43	0,42	2,45	47,55
	17	0,045	1,89	1,90	1,88	5,03	2,96	2,89	38,90	45,00	47,00	46,00	1,41	2,79	47,21
2	1	0,050	1,91	1,90	1,95	2,17	2,39	2,22	23,40	22,90	23,40	23,40	0,00	5,48	44,52
	7	0,046	1,94	1,91	1,92	7,00	4,57	4,79	53,90	59,60	58,00	58,80	1,13	2,18	47,82
	17	0,043	1,87	1,83	1,82	2,65	2,99	2,41	22,50	21,90	22,30	22,23		5,77	44,23
3	1	0,050	1,79	1,80	1,83	2,87	2,21	2,30	16,40	18,40	17,60	18,00	0,57	7,13	42,87
	7	0,048	1,84	1,83	1,88	2,24	2,39	2,46	22,60	21,70	21,90	22,07	0,47	5,82	44,18
	17	0,046	1,79	1,81	1,80	2,29	2,25	2,28	21,90	21,40	20,90	21,40	0,50	6,00	44,00
4	1	0,048	1,74	1,83	1,79	2,40	3,11	3,33	5,90	5,80	5,60	5,77	0,15	22,25	27,75
	7	0,049	1,48	1,84	1,75	3,75	-83,92	5,31	5,70	5,10	5,30	5,37	0,31	23,91	26,09
	17	0,053	1,71	1,87	1,67	3,37	2,42	2,62	6,90	7,10	7,20	7,07	0,15	18,16	31,84
5	1	0,048	1,71	1,86	1,62	2,51	2,51	3,14	6,60	6,30	5,70	6,20	0,46	20,70	29,30
	7	0,053	1,88	1,82	1,83	2,43	2,40	2,34	27,00	27,70	27,20	27,30	0,36	4,70	45,30
	17	0,050	1,81	1,77	1,84	4,09	4,25	4,58	11,50	11,10	11,30	11,30	0,20	11,36	38,64
6	1	0,047	1,74	1,78	1,90	2,27	2,29	1,51	6,30	6,40	6,40	6,37	0,06	20,16	29,84
	7	0,048	1,82	1,72	1,78	4,94	6,04	4,87	12,30	11,90	12,20	12,13	0,21	10,58	39,42
	17	0,045	1,82	1,81	1,77	3,16	3,13	3,07	22,90	22,70	22,50	22,70	0,20	5,65	44,35
7	1	0,043	1,80	1,75	1,84	2,46	2,38	2,41	14,20	17,20	15,00	14,60	0,57	8,79	41,21
	7	0,043	1,72	1,76	1,77	2,35	2,23	2,35	13,40	13,20	13,20	13,20	0,00	9,72	40,28

	17	0,048	1,66	1,74	1,66	3,82	3,65	3,76	10,90	10,70	10,70	10,70	0,00	11,99	38,01
14	1	0,049	1,75	1,76	1,80	3,91	3,76	3,61	12,60	12,70	12,70	12,70	0,00	10,10	39,90
	7	0,049	1,73	1,76	1,78	2,86	2,95	2,87	13,70	13,40	13,60	13,57	0,15	9,46	40,54
	17	0,043	1,77	1,82	1,74	2,81	2,86	2,71	15,50	15,70	16,40	15,87	0,47	8,09	41,91
28	1	0,045	1,91	1,87	1,91	2,64	2,33	3,30	8,70	9,10	9,50	9,10	0,40	14,10	35,90
	7	0,044	1,97	1,96	1,98	0,73	0,82	1,60	9,60	9,90	8,10	9,75	0,21	13,16	36,84
	17	0,051	1,86	1,86	1,88	1,27	1,81	1,69	9,40	9,00	9,30	9,23	0,21	13,90	36,10

TABELA 20. VALORES DE Ct PARA AS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO 2014.

DAE	PARCELA	$T_{2014}N_0I^-$	PARCELA	$T_{2014}N_0I^{+5}$	PARCELA	$T_{2014}N_{50}I^-$	PARCELA	$T_{2014}N_{50}I^{+5}$
1	4	37,51	5	36,07	6	36,94	1	36,75
	10	37,76	9	35,42	8	35,71	7	37,60
	14	36,81	15	36,39	16	35,77	17	36,49
2	4	37,15	5	33,25	6	35,00	1	37,36
	10	---	9	36,94	8	37,38	7	37,33
	14	34,12	15	36,83	16	36,60	17	36,63
3	4	35,67	5	34,51	6	35,97	1	35,76
	10	36,39	9	35,50	8	35,29	7	36,37
	14	36,97	15	35,72	16	36,88	17	37,13
4	4	38,04	5	35,72	6	36,86	1	36,97
	10	37,54	9	34,68	8	36,05	7	36,10
	14	36,61	15	35,54	16	35,79	17	38,19
5	4	36,93	5	36,39	6	34,46	1	38,30
	10	36,77	9	35,81	8	37,33	7	37,49
	14	37,11	15	36,24	16	36,86	17	37,43
6	4	33,83	5	36,53	6	32,53	1	37,59
	10	36,34	9	33,17	8	35,53	7	32,51
	14	34,03	15	38,41	16	35,48	17	37,19
7	4	36,57	5	34,68	6	36,35	1	37,28
	10	36,46	9	35,38	8	36,25	7	36,42
	14	35,85	15	38,02	16	36,11	17	37,68
14	4	35,03	5	37,89	6	36,80	1	37,57
	10	38,38	9	36,23	8	37,31	7	36,10
	14	39,59	15	36,55	16	36,68	17	36,82
28	4	37,59	5	36,29	6	36,56	1	36,33
	10	35,89	9	37,19	8	35,18	7	37,63
	14	35,60	15	34,72	16	35,92	17	35,57

TABELA 21. ABRANGÊNCIA TAXONÔMICA DO PAR DE INICIADORES USADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA.

TAXA ¹	NÚMERO DE SEQUÊNCIAS ²	Nº DE TAXA ENCONTRADOS ³				% DE TAXA ENCONTRADOS			
		TOLERÂNCIA DE BASES NÃO PAREADAS ⁴							
		0	1	2	3	0	1	2	3
Domínio									
Bactéria	2.879.170	195.973	548.381	786.998	905.956	6,81	19,05	27,33	31,47
Archaea Outgroup ⁵	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactéria não classificadas	103.238	4.277	19.657	28.289	34.588	4,14	19,04	27,40	33,50
Filo									
Actinobacteria	319.456	314	47.871	60.775	67.557	0,10	14,99	19,02	21,15
Aquificae	2.070	6	10	210	591	0,29	0,48	10,14	28,55
Bacteroidetes	367.909	192	74.027	108.384	132.222	0,05	20,12	29,46	35,94
Caldiserica	349	-	-	-	12	0,00	0,00	0,00	3,44
Chlamydiae	1.126	1	1	3	15	0,09	0,09	0,27	1,33
Chlorobi	1.356	8	331	396	405	0,59	24,41	29,20	29,87
Chloroflexi	39.509	23	268	468	5.245	0,06	0,68	1,18	13,28
Chrysiogenetes	13	-	-	9	10	0,00	0,00	69,23	76,92
Deferribacteres	1.450	19	264	391	405	1,31	18,21	26,97	27,93
Deinococcus-Thermus	4.049	11	1.528	1.772	1.792	0,27	37,74	43,76	44,26
Dictyoglomi	70	-	-	25	26	-	-	35,71	37,14
Elusimicrobia	767	8	285	314	316	1,04	37,16	40,94	41,20
Fibrobacteres	1.577	1	422	622	677	0,06	26,76	39,44	42,93
Fusobacteria	18.033	51	1.377	4.107	6.465	0,28	7,64	22,77	35,85
Gemmatimonadetes	4.733	14	981	1.127	1.181	0,30	20,73	23,81	24,95
Lentisphaerae	2.624	-	2	12	1.654	-	0,08	0,46	63,03
Nitrospirae	7.839	634	1.502	1.865	1.915	8,09	19,16	23,79	24,43
Planctomycetes	27.651	36	7.347	9.828	10.669	0,13	26,57	35,54	38,58
Proteobacteria	944.978	97.803	224.936	318.859	342.347	10,35	23,80	33,74	36,23
Spirochaetes	29.960	350	6.378	8.045	9.406	1,17	21,29	26,85	31,40
Synergistetes	2.829	225	970	1.138	1.206	7,95	34,29	40,23	42,63
Tenericutes	10.117	12	1.639	3.184	3.479	0,12	16,20	31,47	34,39
Thermodesulfobacteria	237	-	40	58	59	-	16,88	24,47	24,89
Thermotogae	1.134	3	291	438	454	0,26	25,66	38,62	40,04
BRC1	603	174	378	385	393	28,86	62,69	63,85	65,17
Parcubacteria	940	-	2	45	72	0,00	0,21	4,79	7,66
Microgenomates	309	-	1	39	75	0,00	0,32	12,62	24,27
SR1	1.053	-	-	-	295	0,00	0,00	0,00	28,02
CandidatusSaccharibacteria	4.956	5	271	617	917	0,10	5,47	12,45	18,50
Latescibacteria	1.143	2	506	538	544	0,17	44,27	47,07	47,59
Armatimonadetes	3.021	3	14	73	1.071	0,10	0,46	2,42	35,45
Verrucomicrobia	26.132	34	93	6.024	8.950	0,13	0,36	23,05	34,25
Acidobacteria	71.755	7.855	13.731	16.988	17.947	10,95	19,14	23,68	25,01
Firmicutes	789.110	82.412	138.945	185.118	222.196	10,44	17,61	23,46	28,16
Cyanobacteria/Chloroplast	66.092	44	550	21.933	25.508	0,07	0,83	33,19	38,59
Marinimicrobia	1.621	13	540	679	821	0,80	33,31	41,89	50,65
Aminicenantes	2.182	1.369	1.502	1.509	1.518	62,74	68,84	69,16	69,57
Omnitrophica	37	-	7	12	17	-	18,92	32,43	45,95
Acetothermia	83	-	25	40	42	-	30,12	48,19	50,60
Poribacteria	353	-	22	22	28	-	6,23	6,23	7,93
Atribacteria	160	-	64	70	72	-	40,00	43,75	45,00
Cloacimonetes	11.166	-	9	147	219	-	0,08	1,32	1,96
CandidatusCalescamantes	5	-	3	4	4	-	60,00	80,00	80,00
candidatdivision WPS - 1	1.130	-	675	724	733	-	59,73	64,07	64,87
candidatedivision WPS - 2	305	1	86	89	89	0,33	28,20	29,18	29,18
Hydrogenedentes	941	20	457	484	496	2,13	48,57	51,43	52,71

candidatedivision ZB3	94	-	-	5	59	-	-	5,32	62,77
Ignavibacteriae	2.095	3	226	817	865	0,14	10,79	39,00	41,29
Nitrospinae	809	50	147	317	329	6,18	18,17	39,18	40,67
Classe									
Chloroplast	18.880	12	54	6.256	6.581	0,06	0,29	33,14	34,86
Gênero									
<i>Azospirillum</i>	651	366	400	415	418	56,22	61,44	63,75	64,21

¹Análise de hibridização *in silico* do par de iniciadores para amplificação do gene 16S rRNA (F-TCGCTAGTAATCGCGGATCA; R-TGTGACGGGCGGTGTGTA) realizada com a ferramenta *Probe Match* do RDP II (rdp.cme.msu.edu), *release* 11, *update* 3; ²Número total de sequências dentro de cada filo; ³Número (Nº) e porcentagem (%) de sequências do gene 16S rRNA encontradas contendo a região dos iniciadores, dentro de cada filo; ⁴São mostrados os resultados para as análises tolerando 0, 1, 2 ou 3 bases não pareadas entre a sequência dos iniciadores e a sequência alvo do gene 16S rRNA; ⁵Para o domínio *Archaea*, somente uma sequência foi testada (*outgroup*) nas análises.